

10/541503

Rec'd PCT/PTO 07 JUL 2005

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION  
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)(19) Organisation Mondiale de la Propriété  
Intellectuelle  
Bureau international(43) Date de la publication internationale  
2 septembre 2004 (02.09.2004)

PCT

(10) Numéro de publication internationale  
WO 2004/073711 A2(51) Classification internationale des brevets<sup>7</sup> :

A61K 31/437, 31/444, 31/706,

A61P 27/06, 27/02, G01N 33/68, 33/94

(21) Numéro de la demande internationale :

PCT/FR2004/000366

(22) Date de dépôt international :

18 février 2004 (18.02.2004)

(25) Langue de dépôt :

français

(26) Langue de publication :

français

(30) Données relatives à la priorité :

03/02021

19 février 2003 (19.02.2003)

FR

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) : EX-  
ONHIT THERAPEUTICS SA [FR/FR]; 26, rue Brunel,  
F-75017 Paris (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) :  
SCHWEIGHOFFER, Fabien [FR/FR]; 38, avenue  
Paul Déroulède, F-94300 Vincennes (FR). RESINK,  
Annelies [NL/FR]; 48, rue Bobillot, F-75013 Paris (FR).  
DESIRE, Laurent [FR/FR]; 70, rue de l'Amiral Mouchez,  
F-75014 Paris (FR). ROUQUETTE, Magali [FR/FR]; 6,  
rue Rampon, F-75011 Paris (FR).(74) Mandataires : BECKER, Philippe. etc.; Becker et Asso-  
ciés, 35, rue des Mathurins, F-75008 Paris (FR).(81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de  
protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM, AT,  
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO,  
CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB,  
GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG,  
KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG,  
MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH,  
PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN,  
TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.(84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de  
protection régionale disponible) : ARIPO (BW, GH, GM,  
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasi-  
en (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), européen (AT,  
BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR,  
HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI  
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE,  
SN, TD, TG).

Déclaration en vertu de la règle 4.17 :

— relative à la qualité d'inventeur (règle 4.17.iv)) pour US  
seulement

Publiée :

— sans rapport de recherche internationale, sera republiée  
dès réception de ce rapportEn ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrégés,  
se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et  
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de  
la Gazette du PCT.

(54) Title: METHODS AND COMPOSITIONS FOR THE TREATMENT OF DEGENERATIVE OCULAR PATHOLOGIES

(54) Titre: METHODES ET COMPOSITIONS POUR LE TRAITEMENT DE PATHOLOGIES DEGENERATIVES OCULAIRES

(57) Abstract: The invention relates to the field of biology, genetics and medicine. In particular, the invention relates to novel meth-  
ods for the detection, characterisation and/or treatment (or management) of neurodegenerative pathologies. The invention also relates  
to methods for the identification or screening of compounds active in the aforementioned pathologies. The invention further relates  
to the compounds, genes, cells, plasmids or compositions which are used to carry out the above-mentioned methods. The invention  
is based on the identification of the role of phosphodiesterase 4B, the peripheral benzodiazepine receptor (PBR) and GABA(A)-type  
GABA receptors in neurodegenerative pathologies. In addition, the invention outlines the use of same as therapeutic, diagnostic or  
experimental markers or targets for said disorders.(57) Abrégé : La présente invention concerne le domaine de la biologie, de la génétique et de la médecine. Elle concerne notamment  
de nouvelles méthodes pour la détection, la caractérisation et/ou le traitement (ou la prise en charge) de pathologies neurodégéné-  
ratives. L'invention concerne également des méthodes pour l'identification ou le criblage de composés actifs dans ces pathologies.  
L'invention concerne également les composés, gènes, cellules, plasmides ou compositions utiles pour la mise en oeuvre des méthodes  
ci-dessus. L'invention découle notamment de l'identification du rôle de la phosphodiésterase 4B du récepteur périphérique aux ben-  
zodiazépines (PBR) et des récepteurs au GABA de type GABA(A) dans les pathologies neurodégénératives et décrit leur utilisation  
comme cible ou marqueur thérapeutique, diagnostique ou expérimental de ces désordres.

BEST AVAILABLE COPY

WO 2004/073711 A2

8/pts  
1

07 JUL 2005

Méthodes et compositions pour le traitement  
de pathologies dégénératives oculaires

La présente invention concerne le domaine de la biologie, de la génétique et de la médecine. Elle concerne notamment de nouvelles méthodes pour la détection, la caractérisation et/ou le traitement (ou la prise en charge) de pathologies neurodégénératives. L'invention concerne également des méthodes pour l'identification ou le criblage de composés actifs dans ces pathologies. L'invention concerne également les composés, gènes, cellules, plasmides ou compositions utiles pour la mise en œuvre des méthodes ci-dessus. L'invention découle notamment de l'identification du rôle de la phosphodiesterase 4B et du récepteur périphérique aux benzodiazépines dans les pathologies neurodégénératives oculaires et décrit leur utilisation comme cible ou marqueur thérapeutique, diagnostique ou expérimental de ces désordres.

De nombreuses pathologies neurodégénératives ont été décrites comme ayant une composante ou un stade lié au phénomène d'apoptose ou mort cellulaire programmée. On peut citer aussi bien les pathologies neurodégénératives du système nerveux central (par exemple la Sclérose Latérale Amyotrophique - SLA-, la maladie de Parkinson ou la maladie d'Alzheimer), que les maladies dégénératives périphériques, notamment oculaires. Ces pathologies disposent actuellement de traitements symptomatiques, notamment de traitement des phénomènes inflammatoires associés, mais pas de traitement des causes réelles de ces désordres, en raison notamment de la complexité des mécanismes et voies métaboliques impliqués, et de la diversité des facteurs causatifs.

La demande WO03/045949 décrit des inhibiteurs de GSK3 utilisables dans les maladies neurodégénératives. Les demandes WO01/49321 et WO01/58469 proposent l'utilisation de composés inhibiteurs du TNF pour traiter des pathologies neurologiques. La demande WO00/15222 propose d'utiliser des composés inhibiteurs de PDE5 dans le traitement des troubles de l'érection. La

demande EP583821 propose des approches thérapeutiques pour le traitement de dérèglements du volume de fluides crâniens.

La demande internationale de brevet n° PCT/FR02/02861 déposée par la  
5 demanderesse décrit de nouvelles cibles moléculaires de la neurotoxicité, ainsi  
que de nouvelles approches thérapeutiques pour le traitement des pathologies  
neurodégénératives. Ces approches sont basées sur une modulation de  
l'activité ou de l'expression d'une phosphodiesterase de type 4, ainsi que sur  
des modifications de la régulation du récepteur périphérique aux  
10 benzodiazépines et du récepteur GABA(A).

La présente demande concerne maintenant de nouvelles stratégies  
thérapeutiques des maladies neurodégénératives oculaires. Ces stratégies sont  
basées sur une modulation d'une ou plusieurs voies métaboliques identifiées  
15 par les inventeurs, qui sont corrélées à l'apparition, au développement et à la  
progression de l'excitotoxicité et de l'apoptose dans les cellules nerveuses, et  
sont particulièrement pertinentes dans les maladies neurodégénératives  
oculaires.

20 Plus particulièrement, un répertoire des altérations de l'épissage de l'ARN dans  
le cerveau et la moelle épinière d'animaux modèles de l'SLA, âgés de 60 jours,  
a été identifié par criblage différentiel qualitatif selon la technique DATAS  
(décrite dans la demande n° WO99/46403). Ce répertoire a été construit à partir  
d'ARN extraits d'échantillons de cerveau et de moelle épinière, sans isolement  
25 préalable des neurones, afin de prendre en compte un maximum d'évènements  
d'épissages alternatifs liés au développement de la pathologie. Le répertoire  
ainsi produit contient plus de 200 séquences distinctes, impliquant des acteurs  
clefs du phénomène d'excitotoxicité, tels que les canaux potassiques et  
calcique. La spécificité des séquences qui constituent ce répertoire est attestée  
30 par le fait que la même analyse différentielle qualitative de l'expression  
génétique réalisée sur des animaux âgés de 90 jours aboutit à un répertoire  
différent, dont sont absents notamment les différents marqueurs de

l'excitotoxicité. L'analyse des modifications d'épissage confirme que les évènements moléculaires sont différents selon le stade de la pathologie.

- De manière particulièrement intéressante et inattendue, la réalisation de DATAS sur des ARN d'animaux contrôles et transgéniques âgés de 60 jours a permis d'isoler des fragments d'ADNc dérivés de l'ARNm de la phosphodiesterase 4B, de la protéine AKAP1 (A Kinase Anchoring Protein) et de la protéine GABA(A)RAPL1 (GABA(A) Receptor Associated Protein Like 1). La protéine PDE4B, capable d'hydrolyser l'AMPc, est impliquée dans la régulation de la concentration intracellulaire d'AMPc. La protéine AKAP1 ancre la sous-unité régulatrice de la protéine kinase A (activée par l'AMPc) à la membrane mitochondriale et régule l'activité du pore de transition mitochondrial en raison de son interaction avec le récepteur périphérique aux benzodiazépines (PBR).
- La présente demande démontre ainsi l'implication des cascades de signalisation dépendantes de l'AMPc, de la régulation du PBR et de la signalisation dépendante du récepteur GABA(A) dans le développement des processus d'excitotoxicité et de mort neuronale.
- Les résultats obtenus montrent plus précisément une expression plus prononcée de PDE4B dans les tissus nerveux pathologiques, liée à une modification structurale de l'ARN correspondant, notamment à la délétion d'une région dans la partie 3' non-codante. Ce résultat est tout à fait compatible avec la présence de séquences de déstabilisation des ARNm dans la séquence identifiée par DATAS. La délétion de ces séquences de déstabilisation de l'ARNm de la PDE4B, par épissage ou par utilisation de séquences de polyadénylation alternatives, peut aboutir à une stabilisation, donc à une augmentation de l'expression, de la partie codante de cet ARN. Cet événement se produit spécifiquement dans le cerveau des sujets pathologiques et non dans les sujets contrôles.

L'identification d'un fragment dérivé de AKAP1 démontre par ailleurs l'implication de cette protéine dans le développement des processus d'excitotoxicité et de mort neuronale. AKAP1 interagit avec la sous-unité régulatrice de la protéine kinase A et avec le récepteur périphérique aux benzodiazépines (PBR), qui participe à la régulation de l'ouverture du pore mitochondrial de transition, ouverture qui caractérise l'exécution de l'apoptose. Par conséquent l'invention suggère que AKAP1 régule l'intervention du PBR dans les phénomènes de morts cellulaires tels la mort neuronale.

L'identification d'un fragment dérivé de GABA(A)RAPL1 souligne une dérégulation de la signalisation dépendante du récepteur GABA(A). Cette observation est tout à fait compatible avec l'importance du neurotransmetteur comme inhibiteur de transmission synaptique, notamment par son interaction avec le récepteur GABA(A). Cette inhibition permet de protéger les neurones contre une excitation soutenue qui pourrait conduire à la mort neuronale par excitotoxicité. Nos travaux indiquent donc une altération de ce niveau de régulation.

La présente invention décrit donc trois événements moléculaires originaux caractérisés par une altération de l'expression de l'ARNm de la PDE4, de AKAP1 et de GABA(A)RAPL1 dans le cerveau de sujets pathologiques, et qui sont corrélés dans le temps avec le phénomène d'excitotoxicité et/ou de mort neuronale. Ces voies de signalisation, médiées par l'AMPc, régulant le PBR, et relayant les signaux dépendant du GABA, définissent de nouvelles stratégies pour le développement de thérapeutiques des maladies neurodégénératives, utilisables notamment à des phases précoces de leur évolution, et s'adressant aux véritables bases moléculaires de la pathologie et non aux symptômes ou composantes inflammatoires associées.

La possibilité d'agir sur l'une ou, de préférence, simultanément sur ces trois voies métaboliques conduirait ainsi à des traitements particulièrement efficaces des maladies neurodégénératives, notamment oculaires. En effet, il est connu

que les neurodégénérences de la rétine (et notamment la perte des photorécepteurs) sont associées à des variations des taux rétinien de nucléotides cycliques (GMPc, AMPc). La modulation de ces taux pourrait donc être bénéfique dans le traitement de maladies neurodégénératives oculaires, notamment par le contrôle de l'excitotoxicité.

Un premier aspect de l'invention concerne donc l'utilisation d'un ligand du PBR pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement des pathologies neurodégénératives, notamment des pathologies neurodégénératives oculaires.

Un autre aspect de l'invention réside dans l'utilisation d'un composé inhibiteur de la PDE4 pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement des maladies neurodégénératives oculaires.

Un troisième aspect de l'invention réside dans l'utilisation d'un composé régulateur de l'activité des récepteurs GABA(A) pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement des maladies neurodégénératives oculaires.

Un objet plus particulier de l'invention concerne l'utilisation d'un composé inhibiteur de la PDE4 appartenant à la famille des pyrazolopyridines pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée à augmenter la survie neuronale chez les patients atteints de maladies neurodégénératives oculaires.

Un autre objet de l'invention concerne l'utilisation d'un composé inhibiteur de la PDE4 appartenant à la famille des pyrazolopyridines, pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée à inhiber ou réduire la mort neuronale par excitotoxicité lors des maladies neurodégénératives oculaires.

De manière préférée, le composé inhibiteur de la PDE4 est également un ligand du récepteur périphérique aux benzodiazépines (PBR) et/ou un ligand des sous-

unités beta des récepteurs GABA(A). De tels composés permettent en effet d'agir avantageusement sur trois voies métaboliques impliquées dans les maladies neurodégénératives. Un composé particulièrement préféré est l'étazolate.

5

Dans un autre mode de mise en œuvre, on utilise, en combinaison, trois composés, l'un étant un inhibiteur de la PDE4, un second étant un ligand des récepteurs GABA(A), l'autre un ligand du récepteur périphérique aux benzodiazépines (PBR). L'utilisation combinée peut être simultanée, séparée ou

10

espacée dans le temps.

Dans un autre mode de réalisation, le composé est un acide nucléique anti-sens capable d'inhiber la transcription du gène de la PDE4B, de AKAP1 ou de GABA(A)RAPL1, ou la traduction de l'ARN messager correspondant.

15

L'invention est particulièrement adaptée au traitement des atteintes dégénératives de la rétine et notamment au traitement de la rétinite pigmentaire, de la dégénérescence maculaire, des conséquences rétinienne du glaucome ou des rétinopathies diabétiques.

20

L'invention permet également le développement de tests, kits ou procédés de détection, dépistage ou diagnostic in vitro de ces pathologies, basés sur une détermination de la présence d'une dérégulation ou d'une altération dans un gène, un messager ou une protéine PDE4 ou, AKAP1 ou encore

25

GABA(A)RAPL1 chez un sujet. L'invention fournit également des outils pour la mise en œuvre de tels tests, notamment des sondes, amorces, cellules, réactifs, etc.

30

L'invention fournit également des tests ou procédés pour cribler des molécules candidates pour le traitement des maladies neurodégénératives, comprenant la détermination de la capacité des molécules à lier le récepteur PBR, AKAP1, GABA(A)RAPL1, le récepteur GABA(A) et/ou la PDE4.

Un autre objet de l'invention concerne une composition pharmaceutique comprenant un composé de la famille des pyrazolopyridines et un excipient acceptable sur le plan pharmaceutique et adapté à une administration extra- ou intra-oculaire. De préférence, le composé est tel que défini ci-après, notamment l'étazolate. La composition est typiquement sous forme de solution injectable, d'un collyre, gel, gouttes, etc...

### Thérapie

La présente invention concerne donc, de manière générale, l'utilisation d'inhibiteurs de PDE4 et/ou de ligands de PBR et de GABA(A) pour le traitement de maladies neurodégénératives oculaires.

L'utilisation d'inhibiteurs de PDE4 n'a jamais été envisagée pour améliorer la viabilité neuronale et plus particulièrement leur protection contre l'excitotoxicité. Les inhibiteurs de PDE4, développés pour inhiber les phénomènes inflammatoires, ont été suggérés comme potentiellement utiles dans des pathologies neurodégénératives centrales comme la maladie d'Alzheimer. Cette suggestion s'appuie sur la volonté de réduire l'inflammation observée dans le cerveau au cours des processus neurodégénératifs et nullement sur un rationnel visant à inhiber directement la mort neuronale. En outre, cette suggestion ne concerne nullement les maladies périphériques, notamment oculaires.

La présente invention montre l'existence d'événements d'épissage ou de sites de polyadénylation alternatifs affectant les gènes de la PDE4 et de AKAP1 et de GABA(A)RAPL1, associés au développement de l'excitotoxicité neuronale, et fournit la base moléculaire qui justifie l'utilisation d'inhibiteurs de PDE4 et/ou de ligands du PBR et de récepteur GABA(A) pour le traitement des maladies neurodégénératives oculaires et plus généralement pour améliorer la viabilité neuronale lors des phénomènes d'excitotoxicité, en particulier dès les phases précoces de ces pathologies.



Un objet de l'invention réside donc dans l'utilisation d'un composé inhibiteur de la PDE4 et/ou d'un ligand de PBR et de récepteur GABA(A) pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement des maladies neurodégénératives oculaires, notamment à promouvoir ou favoriser la survie neuronale chez des patients atteints.

De manière préférée, le composé inhibiteur de la PDE4 est en outre un ligand du récepteur périphérique aux benzodiazépines (PBR) et de récepteur GABA(A). De tels composés permettent en effet d'agir avantageusement sur trois voies métaboliques impliquées dans les maladies neurodégénératives.

Dans un autre mode de mise en œuvre, on utilise, en combinaison, trois composés, l'un étant un inhibiteur de la PDE4, un second un ligand du récepteur périphérique aux benzodiazépines (PBR) et le troisième un ligand du récepteur GABA(A). L'utilisation combinée peut être simultanée, séparée ou espacée dans le temps.

Un autre objet de l'invention réside dans une méthode de traitement d'une pathologie neurodégénérative oculaire, comprenant l'administration à un sujet d'un composé inhibiteur de PDE4 et/ou ligand du PBR et de récepteur GABA(A), de préférence un composé inhibiteur de PDE4 et ligand du PBR et de récepteur GABA(A).

Un autre objet de l'invention réside dans une méthode pour augmenter la survie des neurones chez des patients atteints de maladie neurodégénérative oculaire, comprenant l'administration à un sujet d'un composé tel que défini ci-avant.

Un autre objet de l'invention réside dans l'utilisation d'un composé tel que défini ci-avant pour inhiber ou réduire l'excitotoxicité neuronale lors des maladies neurodégénératives oculaires, c'est-à-dire plus particulièrement pour inhiber ou

réduire la mort neuronale par excitotoxicité lors des maladies neurodégénératives oculaires.

Un autre aspect de l'invention concerne l'utilisation d'au moins un composé inhibiteur de PDE4 appartenant à la famille des pyrazolopyridines, pour la  
5 préparation d'une composition pharmaceutique destinée à augmenter la survie neuronale chez les patients atteints de maladies neurodégénératives oculaires.

Dans le contexte de l'invention, le terme « traitement » désigne le traitement  
10 préventif, curatif, palliatif, ainsi que la prise en charge des patients (réduction de la souffrance, réduction du déficit fonctionnel, amélioration de la durée de vie, ralentissement de la progression de la maladie, amélioration de la survie des neurones, protection des neurones contre l'excitotoxicité ou l'apoptose, etc.). Le traitement peut en outre être réalisé en combinaison avec d'autres agents ou  
15 traitements, notamment intervenant sur les événements tardifs de la pathologie, tels que des inhibiteurs de caspases ou autres composés actifs.

Le terme « composé inhibiteur de PDE4 » désigne tout composé capable d'inhiber l'expression ou l'activité de la PDE4, notamment la PDE4B, c'est-à-dire  
20 en particulier tout composé inhibant la transcription du gène, la maturation des ARNs, la traduction de l'ARNm, la modification post-traductionnelle de la protéine, l'activité enzymatique de la protéine, son interaction avec un substrat, etc. Il peut s'agir d'un composé inhibant la modification de l'ARN, notamment la délétion d'une partie de la région 3' non-codante.

25

Dans un mode de réalisation particulier, le composé est un acide nucléique anti-sens, capable d'inhiber la transcription du gène de la PDE4B ou de AKAP1 ou de GABA(A)RAPL1 ou la traduction du messenger correspondant. L'acide nucléique anti-sens peut comprendre tout ou partie de la séquence du gène de  
30 la PDE4B ou de AKAP1 ou de GABA(A)RAPL1, d'un fragment de celle-ci, du messenger de la PDE4B ou AKAP1 ou de GABA(A)RAPL1, ou d'une séquence complémentaire à celles-ci. L'antisens peut notamment comprendre une région

complémentaire de la séquence comprise entre les résidus 218-2383 de la séquence Genbank n° AF208023 ou 766-2460 de séquence Genbank n° NM\_002600, et inhiber (ou réduire) sa traduction en protéine. L'antisens peut être un ADN, un ARN, un ribozyme, etc. Il peut être simple-brin ou double-brin. Il  
5 peut également s'agir d'un ARN codé par un gène antisens. S'agissant d'un oligonucléotide antisens, il comprend typiquement moins de 100 bases, par exemple de l'ordre de 10 à 50 bases. Cet oligonucléotide peut être modifié pour améliorer sa stabilité, sa résistance aux nucléases, sa pénétration cellulaire, etc.

10 Selon un autre mode de réalisation, le composé est un peptide, par exemple comprenant une région de la protéine PDE4 (notamment PDE4B) et capable d'antagoniser son activité.

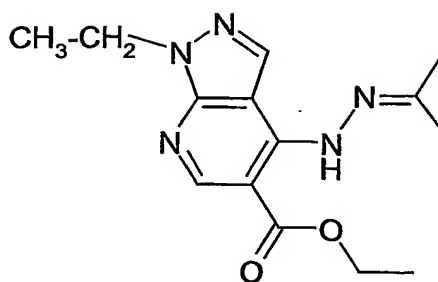
Selon un autre mode de réalisation, le composé est un composé chimique,  
15 d'origine naturelle ou synthétique, notamment une molécule organique ou inorganique, d'origine végétale, bactérienne, virale, animale, eucaryote, synthétique ou semi-synthétique, capable de moduler l'expression ou l'activité de la PDE4B, et/ou de lier le récepteur PBR et/ ou un récepteur au GABA de type GABA(A)

20

Dans une variante préférée, on utilise un composé de la famille des pyrazolopyridines, parmi lesquels figure notamment l'étazolate. Ceux-ci sont en effet capables de lier le PBR, les récepteurs GABA(A) et d'inhiber les PDE4.

25 Les composés de la famille des pyrazolopyridines sont en particulier choisis parmi les composés suivants :

- L'étazolate de formule suivante :



l'étazolate constituant un mode de mise en œuvre préféré de l'invention,

- 5 - Ester éthylique de l'acide 4-butylamino-1-ethyl-6-methyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique (tracazolate),
- Ester éthylique de l'acide 4-butylamino-1-ethyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
- 10 - 1-(4-amino-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-1-yl)-β-*D*-1-deoxy-ribofuranose
- Ester éthylique de l'acide 1-ethyl-4-(*N'*-isopropylidene-hydrazino)-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique (SQ 20009),
- 15 - 4-amino-6-methyl-1-*n*-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine
- Ester éthylique de l'acide 4-Amino-1-ethyl-6-methyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique (desbutyl tracacolate),
- 20 - 4-amino-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxamide,
- Ester éthylique de l'acide 1-ethyl-6-methyl-4-methylamino-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
- 25 - Ester éthylique de l'acide 4-amino-6-methyl-1-propyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
- Ester éthylique de l'acide 1-ethyl-4-ethylamino-6-methyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
- 30 - Ester éthylique de l'acide 4-amino-1-butyl-6-methyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
- 35 - 5-(4-amino-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-1-yl)-2-hydroxymethyl-tetrahydro-furan-3-ol,
- ester allylique de l'acide 1-allyl-4-amino-6-methyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
- 40 - acide 4-amino-6-methyl-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,

- ester éthylique de l'acide 4-amino-1-ethyl-3,6-dimethyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
- 5 - ester éthylique de l'acide 4-diméthylamino-1-ethyl-6-méthyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
- ester éthylique de l'acide 1-ethyl-6-méthyl-4-propylamino-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
- 10 - ester éthylique de l'acide 4-amino-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
- ester éthylique de l'acide 4-amino-6-méthyl-1-pent-4-ynyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
- 15 - 4-amino-1-but-3-enyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-allylamide,
- 4-amino-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-isopropylamide,
- 20 - 4-amino-1-pentyl-*N*-*n*-propyl-1*H*-pyrazolo-[3,4-*b*]pyridine-5-carboxamide,
- ester allylique de l'acide 4-amino-1-butyl-6-méthyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
- 25 - ester éthylique de l'acide 4-amino-6-méthyl-1-pent-3-ynyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
- 4-amino-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-prop-2-ynylamide
- 30 - ester allylique de l'acide 4-amino-1-(3-méthyl-butyl)-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
- 4-amino-1-pentyl-1*H*-pyrazolo<3,4-*b*>pyridine-5-*N*-(2-propenyl)carboxamide,
- 35 - ester allylique de l'acide 4-amino-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
- 4-amino-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-butylamide,
- 40 - ester allylique de l'acide 4-amino-1-but-3-ynyl-6-méthyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
- ester allylique de l'acide 4-amino-1-but-3-enyl-6-méthyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
- 45 - 4-amino-6-méthyl-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-allylamide,

- ester allylique de l'acide 4-amino-6-méthyl-1-pentyl-1H-pyrazolo[3,4-b]pyridine-5-carboxylique,
- 5 - ester allylique de l'acide 4-amino-6-méthyl-1-(3-méthyl-butyl)-1H-pyrazolo[3,4-b]pyridine-5-carboxylique,
- ester isobutylique de l'acide 4-amino-6-méthyl-1-pentyl-1H-pyrazolo[3,4-b]pyridine-5-carboxylique,
- 10 - 4-amino-6-méthyl-1-pentyl-1H-pyrazolo[3,4-b]pyridine-5-butylamide,
- ester allylique de l'acide 4-amino-6-méthyl-1-(3-méthyl-but-2-enyl)-1H-pyrazolo[3,4-b]pyridine-5-carboxylique,
- 15 - 4-amino-1-pentyl-1H-pyrazolo[3,4-b]pyridine-5-cyclopropylamide,
- ethyl 4-amino-1-pentyl-1H-pyrazolo[3,4-b]pyridine-5-hydroxamate,
- ester prop-2-ynyl de l'acide 4-amino-6-méthyl-1-pentyl-1H-pyrazolo[3,4-b]pyridine-5-carboxylique,
- 20 - ester allylique de l'acide 4-amino-6-méthyl-1-pent-4-ynyl-1H-pyrazolo[3,4-b]pyridine-5-carboxylique,
- 25 - ester allylique de l'acide 4-amino-6-méthyl-1-pent-4-enyl-1H-pyrazolo[3,4-b]pyridine-5-carboxylique,
- 4-amino-1-pent-3-ynyl-1H-pyrazolo[3,4-b]pyridine-5-propylamide,
- 30 - 4-amino-1-pentyl-1H-pyrazolo[3,4-b]pyridine-5-cyclopropylmethylamide,
- ester 2-méthyl-allylique de l'acide 4-amino-6-méthyl-1-pentyl-1H-pyrazolo[3,4-b]pyridine-5-carboxylique,
- 35 - 4-Amino-1-pent-3-ynyl-1H-pyrazolo[3,4-b]pyridine-5-allylamide (ICI 190,622),
- 4-amino-1-pent-4-ynyl-N-2-propenyl-1H-pyrazolo[3,4-b]pyridine-5-carboxamide,
- 40 - 4-amino-1-pent-3-ynyl-1H-pyrazolo[3,4-b]pyridine-5-prop-2-ynylamide,
- 4-amino-1-pentyl-1H-pyrazolo[3,4-b]pyridine-5-but-2-ynylamide,
- ester allylique de l'acide 4-amino-6-méthyl-1-pent-3-ynyl-1H-pyrazolo[3,4-b]pyridine-5-carboxylique,
- 45 - ester allylique de l'acide 4-amino-1-(2-cyclopropyl-ethyl)-6-méthyl-1H-pyrazolo[3,4-b]pyridine-5-carboxylique,

- ester allylique de l'acide 4-amino-1-hex-5-ynyl-6-methyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
- 5 - 4-amino-1-pent-3-ynyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-cyclopropylmethyl-amide,  
- ester but-3-énylique de l'acide 4-amino-6-methyl-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
- 10 - ester cyclopropylméthylique de l'acide 4-amino-6-methyl-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,  
- 4-butylamino-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-allylamide,
- 15 - ester 2-cyclopropyl-éthylque de l'acide 4-amino-6-methyl-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,  
- ester cyclopropylméthylique de l'acide 4-amino-6-methyl-1-pent-3-ynyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
- 20 - ester cyclopropylméthylique de l'acide 4-amino-6-methyl-1-pent-4-ynyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,  
- ester éthylique de l'acide 4-amino-1-benzyl-6-methyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
- 25 - 4-amino-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-benzylamide,  
- 4-amino-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-phenylamide,
- 30 - ester benzylique de l'acide 4-amino-6-methyl-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,  
- 4-Azido-1-β-D-ribofuranosylpyrazolo[3,4-*b*]pyridine,
- 35 - 1-pent-3-ynyl-N-2-propenyl-4-propionamido-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxamide,
- 40 - 2-(4-amino-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-1-yl)-5-hydroxyméthyl-tetrahydro-furan-3,4-diol,  
- 2-(6-méthyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-4-ylamino)-éthanol,
- 45 - 3-(6-méthyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-4-ylamino)-propan-1-ol,  
- ester propylique de l'acide 3-(6-méthyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-4-ylamino)-acétique,

- ester éthylique de l'acide 2-(6-méthyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-4-ylamino)-propionique,
- 5 - ester éthylique de l'acide 2-(6-méthyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-4-ylamino)-pentanoïque,
- ester éthylique de l'acide 2-(6-méthyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-4-ylamino)-benzoïque,
- 10 - ester propylique de l'acide 3-(6-méthyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-4-ylamino)-pentanoïque,
- *N*-benzylidene-*N'*-(3-méthyl-1-phenyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-4-yl)-hydrazine,
- 15 - *N*-furan-2-ylmethylene-*N'*-(3-méthyl-1-phenyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-4-yl)-hydrazine,
- *N*-(4-fluoro-benzylidene)-*N'*-(3-méthyl-1-phenyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-4-yl)-hydrazine,
- 20 - *N*-(3-furan-2-yl-allylidene)-*N'*-(3-méthyl-1-phenyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-4-yl)-hydrazine,
- *N*-(4-methoxy-benzylidene)-*N'*-(3-méthyl-1-phenyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-4-yl)-hydrazine,
- 25 - 4-[(3-méthyl-1-phenyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-4-yl)-hydrazonométhyl]-benzonitrile,
- 30 - *N*-benzo[1,3]dioxol-5-ylmethylene-*N'*-(3-méthyl-1-phenyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-4-yl)-hydrazine,
- *N*-(3-méthyl-1-phenyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-4-yl)-*N'*-(4-nitro-benzylidene)-hydrazine,
- 35 - *N*-(3-méthyl-1-phenyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-4-yl)-*N'*-(2-nitro-benzylidene)-hydrazine,
- *N*-(3-méthyl-1-phenyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-4-yl)-*N'*-(4-trifluorométhyl-benzylidene)-hydrazine,
- 40 - *N*-(3-méthyl-1-phenyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-4-yl)-*N'*-(5-nitro-furan-2-ylmethylene)-hydrazine,
- 45 - *N*-(3-méthyl-1-phenyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-4-yl)-*N'*-(2-trifluorométhyl-benzylidene)-hydrazine,



- *N*-(3-methyl-1-phenyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-4-yl)-*N'*-(6-nitro-benzo[1,3]dioxol-5-ylmethylene)-hydrazine,
- 5 - Acide 4-(3-chloro-4-methoxy-benzylamino)-1-ethyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
- 4-(3-chloro-4-methoxy-benzylamino)-1-ethyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-(pyridin-4-ylmethyl)-amide,
- 10 - 4-(3-chloro-4-methoxy-benzylamino)-1-ethyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-(tetrahydro-furan-2-ylmethyl)-amide,
- 4-(3-chloro-4-methoxy-benzylamino)-1-ethyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-(5-hydroxy-pentyl)-amide,
- 15 - 4-(3-chloro-4-methoxy-benzylamino)-1-ethyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-[3-(2-oxo-pyrrolidin-1-yl)-propyl]-amide,
- ester éthylique de l'acide 4-*tert*-butylamino-1-(2-chloro-2-phenyl-ethyl)-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
- 20 - ester éthylique de l'acide 1-(2-chloro-2-phenyl-ethyl)-4-cyclopropylamino-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
- 25 - ester éthylique de l'acide 1-(2-chloro-2-phenyl-ethyl)-4-propylamino-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
- ester éthylique de l'acide 1-(2-chloro-2-phenyl-ethyl)-4-phenylamino-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
- 30 - ester éthylique de l'acide 4-butylamino-1-(2-chloro-2-phenyl-ethyl)-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
- ester éthylique de l'acide 1-(2-chloro-2-phenyl-ethyl)-4-(2-ethoxy-ethylamino)-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
- 35 - ester éthylique de l'acide 4-benzylamino-1-(2-chloro-2-phenyl-ethyl)-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
- 40 - ester éthylique de l'acide 1-(2-chloro-2-phenyl-ethyl)-4-phenethylamino-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique.

L'invention révèle que ces composés présentent l'intérêt inégalé de pouvoir interférer avec trois évènements moléculaires impliqués dans la régulation de la

45 vie cellulaire. Ils maintiennent d'une part la concentration d'AMPc intracellulaire à un niveau qui prévient l'activation des cascades apoptotiques de mort

cellulaire, et d'autre part interfèrent avec l'exécution proprement dite de l'apoptose en inhibant l'ouverture du pore de transition mitochondrial. De plus, ils sont capables de réguler l'activité des récepteurs GABA(A) et donc de réguler l'activité électrophysiologique (polarisation) des neurones, permettant de les  
5 protéger contre l'excitotoxicité.

Une autre propriété de ces composés est d'inhiber préférentiellement, parmi les phosphodiesterases, les phosphodiesterases AMPc dépendantes, c'est-à-dire qui hydrolysent l'AMPc intracellulaire. Par conséquent, ces composés  
10 n'affectent pas la concentration de GMPc. Augmenter la concentration est avantageux lorsqu'on veut maintenir la viabilité de neurones tels que les motoneurones. En revanche, les cellules de la rétine, comme les bâtonnets, souffrent d'un excès de GMPc, l'augmentation de l'AMPc étant moins critique. Par conséquent, les pyrazolopyridines sont particulièrement adaptées au  
15 traitement des dégénérescences de la rétine, qui sont les caractéristiques de la rétinite pigmentaire, de la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA), des conséquences du glaucome et des rétinopathies, notamment diabétiques.

La présente invention propose donc, pour la première fois, la PDE4, le PBR et  
20 les récepteurs GABA(A) comme cibles thérapeutiques, de préférence combinées, pour le traitement des événements moléculaires associés à l'excitotoxicité, notamment dans les maladies neurodégénératives oculaires. Selon des modes de mise en œuvre particuliers, l'invention peut être utilisée pour inhiber ou réduire l'excitotoxicité neuronale en phase précoce de ces  
25 maladies. Elle est applicable notamment au traitement des conséquences rétinienues du glaucome, incluant le glaucome à angle ouvert et le glaucome à angle fermé, de la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA), des rétinopathies diabétiques et de la rétinite pigmentaire.

30 D'autres exemples de pathologies oculaires comprennent notamment les conséquences rétinienues de l'hypertension oculaire, les maculopathies et les dégénérescences rétinienues telles que la Dégénérescence Maculaire liée à

l'Age (DMLA) dans ses formes exsudatives et non-exsudative (« sèche »), la néovascularisation choroïdienne, la rétinopathie diabétique, la chorio-rétinopathie séreuse centrale, l'œdème maculaire cystoïde, l'œdème maculaire diabétique, la dégénérescence rétinienne du myope ; les infections (syphilis, Maladie de Lyme, tuberculose, toxoplasmose) ; les maladies inflammatoires de l'œil, telles que l'épithéliopathie multifocale placoïde pigmentaire aiguë, la maladie de Behcet, la rétinopatie choroïdienne de Birdshot, les uvéites (antérieures, postérieures, panuvéites), la choroïdite multifocale, le Multiple Evanescent White Dot Syndrome (MEWDS), la sarcoidose oculaire, la sclérite postérieure, la choroïdite serpiginieuse, la fibrose sous rétinienne, le syndrome de Vogt-Koyanagi-Harada, la choroïdopathie ponctuée, la neuro-rétinopathie maculaire aiguë, les maladies vasculaires et exsudatives telles que la rétinopathie diabétique, l'occlusion de l'artère centrale de la rétine et/ou de ses branches, l'occlusion de la veine centrale de la rétine, les coagulations intra-vasculaires disséminées, les modifications du fond d'œil liées à l'hypertension artérielle, le syndrome ischémique oculaire, les micro anévrysmes artériels rétiens , les traumatismes rétiens, les décollements de la rétine, les trous maculaires, les tumeurs de la rétine telles que l'hypertrophie congénitale du RPE, les hémangiomes choroïdaux, les ostéomes choroïdaux, les métastases choroïdales, le rétinoblastome, l'hamartome, les tumeurs vasculoprolifératives du fond d'œil, l'astrocytome rétinien, les tumeurs lymphoïdes de la rétine ; les maladies génétiques de la rétine telles que la Rétinite Pigmentaire, la dystrophie des cônes et des bâtonnets, la maladie de Stargardt et le Fundus Flavimaculatus.

25

Un objet particulièrement préféré selon l'invention réside dans l'utilisation de l'étazolate pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement des maladies neurodégénératives oculaires.

30 Un objet particulièrement préféré selon l'invention réside dans l'utilisation de l'étazolate pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée à

augmenter la survie neuronale chez les patients atteints de maladies neurodégénératives oculaires.

5 Un objet particulièrement préféré selon l'invention réside dans l'utilisation de l'étazolate pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée à inhiber ou réduire l'excitotoxicité neuronale chez les patients atteints de maladies neurodégénératives oculaires.

10 La maladie neurodégénérative oculaire est préférentiellement une rétinite pigmentaire, la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA), les conséquences rétinienne du glaucome (c'est-à-dire notamment la dégénérescence ou la mort des cellules nerveuses de la rétine) ou une rétinopathie.

15 Les composés peuvent être formulés et administrés de différentes façons. L'administration peut être réalisée par toute méthode connue de l'homme du métier, de préférence par voie orale ou par injection, systémique, locale ou loco-régionale. L'injection est typiquement réalisée par voie intra-oculaire, rétro-oculaire, intra-péritonéale, intra-cérébro-ventriculaire, intra-rachidienne, intra-veineuse, intra-artérielle, sous-cutanée ou intra-musculaire. L'administration par  
20 voie orale, systémique ou rétro- ou intra-oculaire est préférée. Les doses administrées peuvent être adaptées par l'homme de l'art. Typiquement, de 0,01 mg à 100 mg / kg environ sont administrés, pour des composés inhibiteurs de nature chimique. Il est entendu que des administrations répétées peuvent être  
25 réalisées, éventuellement en combinaison avec d'autres agents actifs ou tout véhicule ou excipient acceptable sur le plan pharmaceutique (ex., tampons, solutions saline, isotonique, en présence d'agents stabilisants, etc.).

30 Le véhicule ou excipient acceptable sur le plan pharmaceutique peut être choisi parmi des solutés tampons, solvants, liants, stabilisants, émulsifiants, etc. Des solutés tampons ou diluant sont notamment le phosphate de calcium, sulfate de calcium, lactose, cellulose, kaolin, mannitol, chlorure de sodium, amidon, sucre

en poudre et hydroxy propyl methyl cellulose (HPMC) (pour libération retard). Des liants sont par exemple l'amidon, la gélatine et des solutés de remplissage comme le sucre, glucose, dextrose, lactose, etc. Des gommes naturelles ou synthétiques peuvent aussi être utilisées, comme notamment l'alginate, la carboxymethylcellulose, la méthylcellulose, la polyvinyl pyrrolidone, etc. D'autres excipients sont par exemple la cellulose et du stéarate de magnésium. Des agents stabilisants peuvent être incorporés aux formulations, comme par exemple des polysaccharides (acacia, agar, acide alginique, gomme guar et tragacanth, la chitine ou ses dérivés et des éthers de cellulose. Des solvants ou solutés sont par exemple la solution Ringer, l'eau, l'eau distillée, des tampons phosphates, des solutions salines phosphatées, et autres fluides conventionnels. Des formulations de type collyre, gouttes, etc. peuvent également être réalisées.

L'invention est utilisable chez les mammifères, notamment chez l'être humain. Les résultats présentés dans les exemples illustrent l'efficacité de l'invention pour améliorer la viabilité de neurones placés en conditions d'excitotoxicité, notamment sur cultures de rétines, et décrivent les résultats d'administrations chez l'homme.

20

#### Détection, Diagnostic et dépistage

Un autre objet de l'invention réside dans une méthode de détection d'une situation d'excitotoxicité ou de stress neuronal chez un sujet, comprenant la mesure in vitro de l'expression de AKAP1, GABA(A)RAPL1 et/ou de la PDE4 dans un échantillon provenant du sujet. La méthode comprend avantageusement une mesure de l'expression différentielle de la région 3' non-codante du gène PDE4B et du reste du gène, notamment de la partie codante.

Un autre objet de l'invention réside donc dans une méthode de détection d'une situation d'excitotoxicité ou de stress neuronal chez un sujet, comprenant la détection de la présence d'une forme mutée de l'ARN de AKAP1,

GABA(A)RAPL1 et/ou de la phosphodiesterase 4, notamment de la phosphodiesterase 4B, en particulier d'une forme délétée de tout ou partie de la région 3' non-codante, dans un échantillon provenant du sujet.

- 5 Un autre objet de l'invention réside dans l'utilisation d'un acide nucléique comprenant tout ou partie d'une séquence dérivée du gène ou de l'ARN messager de AKAP1, GABA(A)RAPL1 ou de la PDE4B pour la mise en œuvre d'une méthode de diagnostic ou de détection d'une situation de stress neuronal et plus particulièrement la situation d'excitotoxicité.

10

L'invention réside, généralement, dans l'utilisation d'un acide nucléique complémentaire de tout ou partie du gène ou du messager de AKAP1, GABA(A)RAPL1 et/ou de la PDE4B, pour la détection d'événements pathologiques de type excitotoxicité, stress ou mort neuronale, etc. Plus  
15 généralement, l'invention repose sur une méthode de diagnostic, dépistage, caractérisation ou suivi d'une pathologie dégénérative oculaire, comprenant la mise en évidence d'une altération dans le gène PDE4 et/ou AKAP1, GABA(A)RAPL1, ou dans l'ARN correspondant.

- 20 L'expression de AKAP1, GABA(A)RAPL1 et/ou de la PDE4, ou le différentiel d'expression, ou la présence d'une forme altérée peuvent être déterminés par des techniques conventionnelles de biologie moléculaire, comme par exemple par séquençage, hybridation, amplification, RT-PCR, migration sur gel, etc. L'invention est applicable au diagnostic ou la détection de différentes  
25 pathologies impliquant les phénomènes d'excitotoxicité, telles que les maladies neurodégénératives oculaires (rétinopathies, conséquences rétinienne du glaucome, dégénérescence maculaire liée à l'âge, etc.). Elle peut être utilisée pour la détection précoce, la mise en évidence d'une prédisposition, le choix et l'adaptation d'un traitement, le suivi de l'évolution de la pathologie, etc.

30

Pour la mise en œuvre des méthodes génétiques de diagnostic ou de détection selon l'invention, on utilise plus particulièrement des acides nucléiques capables

de mettre en évidence une forme délétée de l'ARNm de AKAP1, de GABA(A)RAPL1 ou de la PDE4B, notamment une forme dépourvue de tout ou partie de la région 3' non codante de la PDE4B. A titre d'exemple spécifique, on utilise un acide nucléique complémentaire de tout ou partie de la région  
5 comprise entre les résidus 2760 à 2869 de la séquence Genbank n° AF208023, ou des résidus correspondants de la séquence du gène ou de l'ARNm de la PDE4B humaine. La séquence de l'ADNc codant la PDE4B humaine est disponible dans Genbank, n° NM\_002600. La région 3' non-codante de l'ARN ou du gène PDE4B humain correspond aux résidus 2461 à 4068 de la  
10 séquence Genbank n° NM\_002600.

Avantageusement, l'acide nucléique utilisé (comme sonde) comprend tout ou partie de la séquence codant la région 3' non-codante du gène ou de l'ARN de la PDE4B comprise entre les nucléotides 2384 et 2869 de la séquence Genbank  
15 n° AF208023 ou entre les nucléotides 2461 et 4068 de la séquence Genbank n° NM\_002600 ou une séquence complémentaire de celles-ci.

Selon des modes particuliers de mise en œuvre, l'invention utilise un acide nucléique complémentaire d'une région comprise dans une séquence suivante :

- 20 - résidus 2384 à 2869 de la séquence Genbank n° AF208023
- résidus 2500 à 2869 de la séquence Genbank n° AF208023
- résidus 2760 à 2869 de la séquence Genbank n° AF208023
- résidus 2780 à 2850 de la séquence Genbank n° AF208023
- résidus 2790 à 2810 de la séquence Genbank n° AF208023
- 25 - résidus 2600 à 4040 de la séquence Genbank n° AF208023
- résidus 3000 à 4040 de la séquence Genbank n° AF208023
- résidus 3500 à 4040 de la séquence Genbank n° AF208023
- résidus 3900 à 4040 de la séquence Genbank n° AF208023.

30 Selon un autre mode particulier, on utilise un acide nucléique complémentaire de la séquence de la région de l'ARN de PDE4 résultant de la délétion de tout ou partie de la partie 3' non codante. L'élimination d'un domaine crée en effet de

nouvelles jonctions dans la séquence, qui sont spécifiques de la forme délétée et peuvent être utilisées pour mettre en évidence la présence d'une telle forme dans un échantillon.

- 5 La complémentarité entre la sonde et la séquence cible est, de préférence, parfaite pour assurer une meilleure spécificité d'hybridation. Toutefois, il est entendu que certains mésappariements peuvent être tolérés. L'acide nucléique utilisé pour la mise en œuvre des méthodes ci-dessus peut être un ADN ou un ARN, de préférence un ADN d'origine synthétique. Il comporte de préférence de
- 10 10 à 500 bases, typiquement de 10 à 100 bases. Il est entendu qu'un acide nucléique plus long peut être utilisé, si désiré, bien que cela ne soit pas préféré. L'acide nucléique est avantageusement un ADN simple brin, de 10 à 500 bases, complémentaire d'une région au moins de la séquence 3'-non codante de la PDE4B. L'acide nucléique peut être marqué, par exemple par voie radioactive,
- 15 enzymatique, luminescente, fluorescente, chimique, etc.

Une autre approche pour détecter la présence d'une altération du gène AKAP1, GABA(A)RAPL1 ou PDE4 utilise une amorce ou un couple d'amorces nucléiques permettant une amplification sélective d'une portion de l'ARN

20 AKAP1, GABA(A)RAPL1 ou PDE4, de préférence comprenant une portion de la région 3' non codante de PDE4 ou codante de AKAP1, GABA(A)RAPL1. On utilise typiquement une amorce permettant l'amplification sélective de la forme altérée de l'ARN de AKAP1, GABA(A)RAPL1 ou de PDE4, notamment d'une amorce spécifique de la jonction créée par l'élimination d'une partie de l'ARN

25 par épissage.

A cet égard, un objet de l'invention réside dans une amorce complémentaire d'une partie de l'ARN de AKAP1, et permettant l'amplification d'une partie de cet ARN. L'amorce comporte avantageusement de 8 à 20 bases. Elle est

30 préférentiellement composée d'un fragment de 8 à 20 résidus consécutifs de la séquence donnée dans Genbank sous le n° NM 009648, plus préférentiellement d'une partie au moins de la région couverte par les nucléotides 1794 à 2322 de



cette séquence. Cette région recouvre notamment un domaine « RNA binding » de la famille KH. Un autre objet de l'invention réside dans un couple d'amorce permettant l'amplification spécifique d'une partie au moins de l'ARN de AKAP1, le dit couple comprenant au moins une amorce telle que définie ci-dessus.

5

A cet égard, un objet de l'invention réside dans une amorce complémentaire d'une partie de l'ARN de GABA(A)PL1, et permettant l'amplification d'une partie de cet ARN. L'amorce comporte avantageusement de 8 à 20 bases. Elle est préférentiellement composée d'un fragment de 8 à 20 résidus consécutifs de la

10 séquence donnée dans Genbank sous le n° BC 024706, plus préférentiellement d'une partie au moins de la région couverte par les nucléotides 999 à 1400 de cette séquence. Cette région correspond à la séquence 3'UTR de l'ARN, impliquée dans sa stabilité et sa traductibilité.

Pour la mise en œuvre des méthodes selon l'invention, on met en contact in

15 vitro un échantillon biologique d'un sujet, contenant un acide nucléique, avec un acide nucléique (sonde, amorce, etc.) tel que défini ci-dessus, et on détecte la formation d'un hybride ou d'un produit d'amplification. L'échantillon biologique peut être un échantillon de sang, de fluide, de cellule, de tissu, etc. L'acide nucléique peut être immobilisé sur un support, de type verre, silice, nylon, etc.

20

Le procédé de détection, dépistage ou diagnostic peut être mis en œuvre à partir de différents types d'échantillons provenant d'un sujet, comme par exemple des biopsies de tissus, notamment de tissu nerveux. De manière particulièrement surprenante et avantageuse, la présente invention montre par

25 ailleurs que la dérégulation de l'expression de PDE4, corrélée au phénomène d'excitotoxicité, peut être mise en évidence directement dans le tissu musculaire.

Un autre objet réside dans un kit pour l'analyse de l'expression de la PDE4, de

30 AKAP1 et/ou de GABA(A)RAPL1, le kit comprenant une sonde nucléotidique spécifique d'une partie de la séquence de l'ARNm de la PDE4, de AKAP1 et/ou de GABA(A)RAPL1 .

Un autre objet réside dans un kit pour l'analyse de l'expression de de AKAP1 et/ou de GABA(A)RAPL1 ., notamment de l'expression de formes altérées de de AKAP1 et/ou de GABA(A)RAPL1, le kit comprenant un couple d'amorces  
5 nucléotidiques permettant l'amplification spécifique d'une partie au moins d'une région de l'ARNm d'un isoforme spécifique de AKAP1 et/ou de GABA(A)RAPL1.

#### Méthodes de sélection et outils

10

D'autres objets de l'invention concernent des méthodes de sélection, identification ou caractérisation de composés actifs sur les pathologies associées à l'excitotoxicité, ou au stress neuronal, notamment sur les pathologies dégénératives oculaires, comprenant la mise en contact de  
15 composés tests avec une cellule exprimant la PDE4B (notamment un variant dépourvu de domaine 3' non-codant) AKAP1 et/ou GABA(A)RAPL1, et la mise en évidence des composés inhibant l'expression ou l'activité de cette protéine.

Les méthodes peuvent être mises en œuvre avec différentes populations  
20 cellulaires, telles que des cellules primaires ou des lignées de cellules d'origine mammifère (humaine, murine, etc.). On utilise avantageusement des cellules qui n'expriment pas naturellement la PDE4B , AKAP1 et/ou GABA(A)RAPL1, transfectées avec un acide nucléique codant le variant souhaité. De cette manière, la sélectivité de la méthode est augmentée. On peut également utiliser  
25 des cellules eucaryotes inférieures (levure, etc.) ou des cellules procaryotes.

Les méthodes de criblage peuvent également être réalisées en système acellulaire, par mesure de la capacité de composés tests à lier la PDE4B, de AKAP1 et/ou de GABA(A)RAPL1 ou un variant ou fragment de celles-ci.

30

Un autre objet de l'invention concerne tout acide nucléique codant un polypeptide tel que défini ci-dessus, les vecteurs le contenant, cellules

recombinantes, et utilisations. Les vecteurs peuvent être des plasmides, phages, cosmides, virus, chromosomes artificiels, etc. Des vecteurs préférés sont par exemple des vecteurs plasmidiques, comme ceux dérivés de plasmides commerciaux (pUC, pcDNA, pBR, etc.). De tels vecteurs comportent  
5 avantageusement un gène de sélection et/ou une origine de réplication et/ou un promoteur transcriptionnel. D'autres vecteurs particuliers sont par exemples des virus ou des phages, notamment des virus recombinants défectifs pour la réplication, tels que des virus dérivés de rétrovirus, adénovirus, AAV, herpès-virus, baculovirus, etc. Les vecteurs peuvent être utilisés dans tout hôte  
10 compétent, comme par exemple des cellules prokaryotes ou eukaryotes. Il peut s'agit de bactéries (par exemple E. coli), levures (par exemple Saccharomyces ou Kluyveromyces), cellules végétales, cellules d'insectes, cellules de mammifères, notamment humaines, etc. Il peut s'agir de lignées, cellules primaires, cultures mixtes, etc.

15

D'autres aspects et avantages de la présente invention apparaîtront à la lecture des exemples qui suivent, qui doivent être considérés comme illustratifs et non limitatifs.

20 Par extension, toutes les applications décrites pour AKAP1 et/ou GABA(A)RAPL1 peuvent être mises en œuvre pour le PBR et les récepteurs GABA(A).

### **LEGENDE DES FIGURES**

25

Figure 1: PCR semi-quantitative de PDE4B à partir d'échantillons de cerveau (1A) et de muscle (1B).

Figure 2: Effet neuroprotecteur de l'étazolate sur la toxicité induite par NMDA/serine sur les cellules granulaires du cervelet.

30 Figure 3: Effet neuroprotecteur de l'étazolate sur la toxicité induite par le kainate sur les cellules granulaires du cervelet.

Figure 4: Effet neuroprotecteur de l'étazolate sur la toxicité induite par NMDA/serine sur les neurones corticaux.

Figure 5: Effet neuroprotecteur de l'étazolate sur la toxicité induite par le kainate sur les neurones corticaux.

5 Figure 6 : Effet neuroprotecteur de l'étazolate sur la toxicité induite par NMDA/sérine sur les cellules de moelle épinière ventrale

Figure 7 : Effet neuroprotecteur de l'étazolate sur la rétine.

## **EXEMPLES**

10

### **Exemple 1 : Identification de la PDE4, de AKAP1 et/ou de GABA(A)RAPL1 comme cibles moléculaires de l'excitotoxicité**

15 L'analyse qualitative différentielle a été effectuée à partir d'ARN poly adénylés (poly A+) extraits d'échantillons de cerveaux d'animaux correspondant aux différents stades, sans isolement préalable des neurones afin de prendre en compte un maximum d'évènements d'épissages alternatifs liés au développement de la pathologie.

20 Les ARN poly A+ sont préparés selon des techniques connues de l'homme de métier. Il peut s'agir en particulier d'un traitement au moyen d'agents chaotropiques tels que le thiocyanate de guanidium suivi d'une extraction des ARN totaux au moyen de solvants (phénol, chloroforme par exemple). De telles méthodes sont bien connues de l'homme du métier (voir Maniatis et al., Chomczynski et al., Anal. Biochem. 162 (1987) 156), et peuvent être aisément  
25 pratiquées en utilisant des kits disponibles dans le commerce. A partir de ces ARN totaux, les ARN poly A+ sont préparés selon des méthodes classiques connues de l'homme de métier et proposées par des kits commerciaux.

Ces ARN poly A+ servent de matrice à des réactions de transcription inverse à l'aide de reverse transcriptase. Avantagusement sont utilisées des reverse  
30 transcriptases dépourvues d'activité RNase H qui permettent d'obtenir des premiers brins d'ADN complémentaire de tailles supérieures à ceux obtenus

avec des reverse transcriptases classiques. De telles préparations de reverse transcriptases sans activité RNase H sont disponibles commercialement.

Pour chaque point de la cinétique de développement de la pathologie (30 jours, 60 jours et 90 jours) les ARN poly A+ ainsi que les ADNc simple brins sont  
5 préparés à partir des animaux transgéniques (T) et des animaux contrôles syngéniques (C).

Conformément à la technique DATAS, pour chaque point de la cinétique sont réalisées des hybridations d'ARNm (C) avec des ADNc (T) et des hybridations réciproques d'ARNm (T) avec des ADNc (C).

10 Ces hétéroduplex ARNm/ADNc sont ensuite purifiés selon les protocoles de la technique DATAS.

Les séquences d'ARN non appariées avec un ADN complémentaire sont libérées de ces hétéroduplex sous l'action de la RNase H, cette enzyme dégradant les séquences d'ARN appariées. Ces séquences non appariées  
15 représentent les différences qualitatives qui existent entre des ARN par ailleurs homologues entre eux. Ces différences qualitatives peuvent être localisées n'importe où sur la séquence des ARN, aussi bien en 5', 3' ou à l'intérieur de la séquence et notamment dans la séquence codante. Selon leur localisation, ces séquences peuvent être non seulement des modifications d'épissage mais  
20 également des conséquences de translocations ou de délétions.

Les séquences d'ARN représentant les différences qualitatives sont ensuite clonées selon les techniques connues de l'homme de métier et notamment celles décrites dans le brevet de la technique DATAS.

Ces séquences sont regroupées au sein de banques de cDNA qui constituent  
25 des banques qualitatives différentielles. Une de ces banques contient les exons et les introns spécifiques de la situation saine ; les autres banques contiennent les événements d'épissage caractéristiques des conditions pathologiques.

L'expression différentielle des clones a été vérifiée par hybridation avec des sondes obtenues par reverse-transcription à partir d'ARN messagers extraits  
30 des différentes situations étudiées. Les clones hybridant de façon différentielle ont été retenus pour analyse ultérieure. Les séquences identifiées par DATAS correspondent à des introns et/ou à des exons exprimées de façon différentielle.

par épissage entre les situations pathologiques et la situation saine. Ces évènements d'épissage peuvent être spécifiques d'une étape donnée du développement de la pathologie ou caractéristiques de l'état sain.

- 5 La comparaison de ces séquences avec les banques de données permet de classifier les informations obtenues et de proposer une sélection raisonnée des séquences selon leur intérêt diagnostique ou thérapeutique.

La réalisation de DATAS sur des ARN d'animaux contrôles et transgéniques  
10 âgés de 60 jours a permis d'isoler un fragment d'ADNc dérivé de l'ARNm de la phosphodiesterase 4B. Ce fragment correspond à un fragment d'exon spécifiquement présent dans les animaux contrôles et donc spécifiquement délété dans les animaux transgéniques pour SOD1G93A au stade 60 jours. Ce fragment recouvre les nucléotides 377 à 486 référencés à partir du codon stop  
15 de la PDE4B de souris (séquence accessible dans GenBank, n°AF208023). Cette séquence comprend 2912 bases, le fragment délété correspondant aux bases 2760 à 2869. Cette région est non codante et est exprimée différemment entre les animaux contrôles et les animaux transgéniques, du fait de l'utilisation alternative d'un exon 3' non codant ou du fait de l'utilisation de  
20 deux sites de polyadénylation alternatifs.

La réalisation de DATAS sur des ARN d'animaux contrôles et transgéniques  
âgés de 60 jours a également permis d'isoler un fragment d'ADNc dérivé de l'ARNm de AKAP1. Ce fragment correspond à un fragment d'exon  
25 spécifiquement présent dans les animaux contrôles et donc spécifiquement délété dans les animaux transgéniques pour SOD1G93A au stade 60 jours. Ce fragment est homologue aux nucléotides 1794 à 2322 de la séquence référencée dans GenBank sous le n°NM\_009648. Cette région est codante et est exprimée différemment entre les animaux contrôles et les animaux  
30 transgéniques, du fait d'un épissage alternatif.

La réalisation de DATAS sur des ARN d'animaux contrôles et transgéniques âgés de 60 jours a également permis d'isoler un fragment d'ADNc dérivé de l'ARNm de GABA(A)RAPL1. Ce fragment correspond à un fragment d'exon spécifiquement présent dans les animaux contrôles et donc spécifiquement  
5 déléte dans les animaux transgéniques pour SOD1G93A au stade 60 jours. Ce fragment est homologue aux nucléotides 1055 à 1461 de la séquence référencée dans GenBank sous le n°BC024706 . Cette région est dérive de la région 3' non-codante et est exprimée différenciellement entre les animaux contrôles et les animaux transgéniques.

10

**Exemple 2 : Expériences de RT-PCR : Confirmation de l'expression différentielle :**

15 L'expression différentielle de la PDE4B dans une situation de stress neuronal, par rapport à une situation de référence, a été vérifiée par des expériences de RT PCR présentées sur la figure 1.

Ces expériences ont été réalisées selon des techniques bien connues de l'homme de métier et ont permis de suivre les expressions de deux régions  
20 distinctes de l'ARNm de la PDE4B. Une de ces régions recouvre le codon d'initiation de cet ARNm (PDE4B 5'), l'autre recouvre en partie le fragment identifié selon la technique DATAS (PDE4B DATAS). Les localisations des amorces de PCR utilisées sont indiquées sur la figure 1.

L'ARN PO correspond à un ARN ribosomal utilisé comme contrôle interne  
25 destiné à vérifier que la même quantité d'ARN est utilisée pour chaque point expérimental. Les analyses ont été réalisées à partir d'ARN extraits d'animaux contrôles (C) et transgéniques (T) âgés de 30, 60 et 90 jours, c'est à dire avant l'apparition des symptômes pathologiques.

Les ARN totaux du cerveau des souris contrôle ou SOD1 G93A âgées 30, 60 et  
30 90 jours sont transcrits en ADNc utilisant le protocole standard de Superscript™ (Invitrogen). Pour les PCR semi-quantitatives les produits de la réaction de reverse transcription sont dilués 10 fois. Les amorces spécifiques du fragment

DATAS correspondent pour le sens aux nucléotides 2526-2545 (5' GCC AGG CCG TGA AGC AAA TA 3' ; SEQ ID NO : 1), et pour l'anti-sens aux 2790-2807 (5' TCA AAG ACG CGA AAA CAT 3'; SEQ ID NO : 2) et pour le fragment plus en 3 prime les amorces correspondent pour le sens aux nucléotides 145-165 (5' CCG CGT CAG TGC CTT TGC TAT 3'; SEQ ID NO : 3), et pour l'anti-sens aux 426-404 (5' CGC TGT CGG ATG CTT TTA TTC AC 3'; SEQ ID NO : 4). Comme gène de référence le gène P0 est utilisé et amplifié par les amorces, sens : 5' TCG CTT TCT GGA GGG TGT C 3' (SEQ ID NO : 5) et anti-sens : CCG CAG GGG CAG CAG TGG 3' (SEQ ID NO :6).

10 L'amplification est effectuée par 30 cycles de PCR suivants :

- 30 secondes à 94°C
- une minute à 57°C
- 30 secondes à 72°C, suivi par un cycle de 2 minutes à 72°C

Les différents produits de PCR sont mis sur un gel d'agarose de 1.5 %.

15 L'expérience est répétée trois fois avec deux réactions de reverse transcription différentes.

La figure 1 présente les résultats obtenus à partir d'ARN extraits des cerveaux ou des muscles des animaux.

20 Alors que la même quantité d'ADNc est amplifiée à partir de l'ARN de PO dans tous les échantillons, de variations sont observées pour l'ARNm de la PDE4B : les variations les plus significatives sont détectées chez les animaux âgés de 90 jours : alors qu'une augmentation du niveau d'expression du fragment PDE4 5' est observée dans le cerveau des animaux transgéniques, une très forte diminution de l'expression de PDE4B (DATAS) est observée dans le cerveau

25 des animaux transgéniques.

Ce résultat établit une corrélation entre la diminution de l'expression d'un fragment 3' non codant de l'ARNm de la PDE4B et l'augmentation de l'expression de la partie 5' codante de ce même messenger. Ce résultat est tout à fait compatible avec la présence de séquences de déstabilisation des ARNm dans la séquence identifiée par DATAS et démontre la corrélation entre

30 l'expression de PDE4B et le phénomène d'excitotoxicité.



### **Exemple 3 : Inhibition de l'excitotoxicité par des ligands de PBR inhibiteurs de PDE4**

- 5 Pour cet exemple, des neurones granulaires du cervelet, des neurones corticaux ainsi que des cellules de moelle épinière ventrale de rat ont été mis en culture selon les techniques connues de l'homme de métier.

#### **Culture primaire des cellules granulaires de cervelet :**

- 10 Les rats Wistar âgés de sept jours sont décapités et leurs cervelets sont disséqués. Après avoir enlevé les méninges, le tissu est coupé en petits morceaux et trypsinisé pendant 15 minutes à 37°C. Les cellules sont dissociées par trituration et mises en cultures à une densité 300.000 cellules par cm<sup>2</sup> dans  
15 du milieu basal Eagle supplémenté avec 10% du sérum de veau foetal et 2 mM glutamine. Le lendemain 10 µM ARA-C, un anti-mitotique, est ajouté pour empêcher la prolifération des cellules gliales. Les cellules sont traitées le jour 9 de cultures avec le composé inhibiteur étazolate, trois heures avant l'addition des toxiques, 50 µM kainate ou 100 µM N-méthyl-D-aspartate en présence de  
20 10 µM D-sérine. Le 8-bromo-cAMP est ajouté juste avant les toxiques. Tous les traitements sont effectués au minimum en double et dans au moins deux cultures différentes. Après une incubation de six heures la toxicité est mesurée par un test MTT. Les résultats, normalisés à la moyenne du non-traité, sont statistiquement analysés par le test de Wilcoxon. La valeur significative est déterminée à *p* inférieur ou égal à 0.05.

25

#### **Cultures primaires des cellules corticales :**

- Des embryons de rat Wistar, âgés de 16 jours, sont prélevés et les cortex sont disséqués. Après la trypsination à 37°C pendant 25 minutes, les cellules sont dissociées par trituration. Les cellules sontensemencées dans du milieu  
30 essentiel minimum, supplémenté avec 10% de sérum de cheval et 10% de sérum de veau foetal et 2 mM glutamine, à une densité de 300.000 cellules par cm<sup>2</sup>. Après 4 jours en culture la moitié du milieu est changée avec du milieu

essentiel minimum supplémenté avec 5% de sérum de cheval et 2 mM glutamine. Le même jour, 10  $\mu$ M de 5-fluoro-2-deoxyuridine, un anti-mitotique, est ajouté. Après sept et onze jours de culture, la moitié du milieu est changée par du milieu conditionné. Le milieu conditionné est composé de MEM  
5 contenant 5 % de sérum de cheval et 2 mM glutamine ; ce milieu est passé sur un tapis d'astrocytes corticales pendant une nuit avant son utilisation. A jour 14, les cellules sont traitées avec le composé inhibiteur étazolate, une heure avant l'addition des toxiques, 50  $\mu$ M kainate ou 20  $\mu$ M N-méthyl-D-aspartate en présence de 10  $\mu$ M D-sérine. Tous les traitements sont effectués au minimum  
10 en double et dans au moins deux cultures différentes. Après une incubation de six heures la toxicité est mesurée par un test MTT. Les résultats, normalisés à la moyenne du non-traité, sont statistiquement analysés par le test de Wilcoxon. La valeur significative est déterminée à  $p$  inférieur ou égal à 0.05.

15 Cultures primaires de cellules de moelle épinière ventrale

Les cellules sont isolées à partir d'embryons de rat Wistar âgés de 14 jours. A leur arrivée, les rates gestantes sont sacrifiées par du dioxyde de carbone.

Le chapelet d'embryons est prélevé et mis dans une boîte contenant du PBS.

La moelle épinière de chaque embryon est disséquée et la corde ventrale est

20 séparée des cordes dorsales. Les cordes ventrales sont ensuite trypsinisées à 37°C pendant 20 min. L'effet de la trypsine est arrêté par l'addition d'un milieu composé de milieu Leibovitz 15, 20% de sérum de cheval, supplément N2 (1X), 20% de glucose (3.2mg/ml), 7.5% de bicarbonate (1.8mg/ml) et de L-glutamine (2mM). Les cellules sont dissociées par trituration. Les amas tissulaires sont  
25 enlevés et les cellules dissociées sont ensuite quantifiées par coloration au bleu de trypan. Les cellulesensemencées à une densité de 250 000 cellules/cm<sup>2</sup> dans un milieu composé de milieu neurobasal, de sérum de cheval (2%), de supplément B27 (1X), et de glutamine (2mM). Après 3 jours de culture *in vitro*, un agent anti-mitotique, l'ARA-C (5 $\mu$ M), est ajouté aux cellules afin d'inhiber la  
30 production de cellules gliales. Les cellules sont mises en culture à 37°C dans un incubateur humidifié (5% CO<sub>2</sub>) pour 9 jours. Après 9 jours de culture, les cellules sont traitées avec le composé inhibiteur : l'étazolate, 3 heures et 1

heure respectivement avant l'ajout de toxiques : 50µM kainate ou 100µM N-methyl-D-aspartate (NMDA) en présence de 10µM D-sérine. Tous les traitements sont effectués au minimum en double et dans au moins deux cultures différentes. Après 3 heures d'incubation avec NMDA/D-serine comme toxique et 1 heure d'incubation avec kainate, la toxicité est révélée par test MTT. Les résultats sont normalisés à la moyenne des contrôles non traités et analysés statistiquement par un test de Wilcoxon avec *p* inférieure à 0.05.

#### MTT:

La toxicité est mesurée en utilisant le test MTT. Après l'incubation avec les composés, du MTT est ajouté à une concentration finale de 0.5 mg/ml par puits. Les plaques sont ensuite incubées pendant 30 minutes à 37 °C dans le noir. Le milieu est aspiré et les cristaux sont resuspendus dans 500 µl de DMSO (dimethylsulfoxyde). L'absorbance à 550 nm est lue et le pourcentage de viabilité est calculé.

#### Résultats :

Les résultats obtenus sont présentés sur les figures 2-6. Ces résultats illustrent l'effet protecteur des composés de l'invention sur la survie neuronale. Lors du co-traitement des neurones par un inhibiteur de l'invention, un effet protecteur dose-dépendent est observé dans les deux modes d'induction de l'excitotoxicité (NMDA/Sérine et kainate).

Les figures 2 et 3 présentent des résultats obtenus à l'aide de l'étazolate sur les cellules granulaires du cervelet. Les résultats présentés montrent que l'étazolate permet d'atteindre sur ces cellules un effet protecteur de 60% dans le cas du traitement NMDA/Ser, et de 57% dans le cas de la toxicité induite par le kainate.

Les figures 4 et 5 présentent des résultats obtenus à l'aide de l'étazolate sur les neurones corticaux. Les résultats présentés montrent que l'étazolate permet

d'atteindre sur ces cellules un effet protecteur de 33% dans le cas du traitement NMDA/Ser, et de 25% dans le cas de la toxicité induite par le kainate.

5 La figure 6 présente les résultats obtenus avec l'étazolate sur les cellules de moelle épinière ventrale. Ces résultats montrent que l'étazolate permet d'atteindre sur ces cellules un effet protecteur de 36% dans le cas du traitement NMDA/Ser.

10 La présente invention documente donc non seulement l'implication de la PDE4B, de PBR et des récepteurs GABA(A) dans les mécanismes d'excitotoxicité, mais également la capacité d'inhibiteurs et de ligands à préserver la viabilité neuronale lors de stress liés à l'excitotoxicité.

#### **Exemple 4 : Expériences *in vitro* utilisant la culture de rétine**

15

Cet exemple décrit les effets d'un inhibiteur de PDE4 sur la rétine de souris rd1, souris caractérisée par la perte de cellules visuelles dès les deux premières semaines après la naissance.

20 Pour chaque concentration d'étazolate (0,02  $\mu$ M, 0,2  $\mu$ M, 2  $\mu$ M et 20  $\mu$ M), six explants de rétine de souris rd1 sont mis en culture pendant 21 jours. La culture commence au jour postnatal 7 et s'effectue dans un milieu en absence de sérum foetal bovin mais contenant l'étazolate à la concentration donnée. Six explants de rétine des mêmes animaux sont utilisés comme contrôles des  
25 explants traités. Dans ce cas, les explants sont cultivés dans du milieu de culture seul ou dans du milieu de culture contenant la solution dans laquelle l'étazolate est diluée. Le milieu de culture des deux conditions (contrôle et traitement) est changé tous les deux jours. Après 21 jours de culture, les explants sont fixés, sectionnés et marqués pour un examen histopathologique.

30

Les explants de souris rd1 non traités (jour postnatal 28) ont perdu la majorité de leurs photorécepteurs en culture, et la présence d'une augmentation des photorécepteurs est alors détectée en comptant les photorécepteurs restants.

## 5 Résultats

Les résultats obtenus avec 2 $\mu$ M d'étazolate montrent que les photorécepteurs des souris rd traités avec l'étazolate sont beaucoup mieux préservés que les photorécepteurs des souris rd-rd, non traitées. Comme le montre la figure 7, les souris rd-rd non traitées présentent les caractéristiques suivantes : un nombre  
10 élevé de cellules picnotiques et une réduction du nombre de noyau des photorécepteurs. En revanche, dans les explants traités avec l'étazolate, la couche des photorécepteurs est beaucoup mieux préservée et ressemble à celle observée sur les souris non transgéniques. Ces explants sont aussi caractérisés par une forte réduction du nombre de cellules picnotiques en  
15 comparaison avec les explants de souris rd-rd non traitées.

### **Exemple 5 : Effet de l'étazolate sur le PBR.**

Pour démontrer cet effet, nous réalisons des expériences sur des cellules HeLa,  
20 cellules décrites comme exprimant le PBR. Le PBR se trouve au contact entre la membrane interne et externe de la mitochondrie. Il fait parti du complexe de pore de transition, qui participe à la régulation du flux de la mitochondrie par ouverture du pore mitochondrial. Il existe des molécules ayant une forte affinité pour le PBR, notamment le Ro5-4864 et le PK11195.

25 En suivant la fluorescence de la rhodamine 1,2,3 spécifique aux mitochondries, nous pouvons suivre l'effet de ligands spécifiques du PBR ainsi que ceux de l'étazolate.

Les résultats ont montré que l'étazolate induisait la même perte de fluorescence que les ligands spécifiques du PBR, Ro5-4864 et PK11195.

30 L'étazolate apparaît donc comme un ligand du PBR qui protège les neurones contre la mort lors des phénomènes d'excitotoxicité.

### **Exemple 6 : Utilisation Clinique chez l'Homme**

Cet exemple décrit les conditions d'utilisation chez l'homme de l'étazolate pour le traitement de maladies neurodégénératives. Cet exemple illustre le potentiel thérapeutique de l'invention et ses conditions d'utilisation chez l'homme.

Dans cette étude, des doses uniques croissantes d'étazolate (0.5, 1, 2, 5, 10 et 20 mg) ont été administrées par voie orale sous forme de gélules dosées à 0.5 et 5 mg à des groupes différents et séquentiels de huit sujets jeunes et sains, volontaires, de sexe masculin. Cette étude a été réalisée dans un seul centre, en double aveugle et deux des huit sujets ont reçu un placebo. Les paramètres évalués ont été la tolérance clinique (apparition d'effets adverses, de signes cliniques, changement dans la pression artérielle ou la fréquence cardiaque), électrocardiographique (enregistrement de l'ECG) et biologique (hématologie et biochimie sanguine, examen urinaire) pendant les 24h suivant l'administration du produit. Un dosage plasmatique du produit a été réalisé chez chaque sujet à différents temps avant et après l'administration du produit (0,25 – 0,50 – 1,00 – 1,50 – 2,00 – 3,00 – 4,00 – 5,00 – 6,00 – 8,00 – 10,00 – 12,00 et 24,00 heures). Un dosage urinaire du produit a également été réalisé à partir des urines collectées avant et après l'administration du produit (4, 4-8, 8-12 et 12-24 heures).

A l'issue de cette phase d'administration de doses croissantes, un groupe supplémentaire de six sujets reçoit à deux reprises une dose d'étazolate : à jeun et au cours d'un repas riche en graisse. L'objectif de cette seconde partie est de comparer l'évolution des taux sanguins du produit entre les deux conditions d'administration. Les paramètres évalués sont la tolérance clinique (apparition d'effets adverses, de signes cliniques, changement dans la pression artérielle ou la fréquence cardiaque), électrocardiographique (enregistrement de l'ECG) et biologique (hématologie et biochimie sanguine, examen urinaire) pendant les 24h suivant l'administration du produit. Un dosage plasmatique du produit est réalisé chez chaque sujet à différents temps avant et après l'administration du

produit (0,25 – 0,50 – 1,00 – 1,50 – 2,00 – 3,00 – 4,00 – 5,00 – 6,00 – 8,00 – 10,00 – 12,00 et 24,00 heures). Un dosage urinaire du produit est également réalisé à partir des urines collectées avant et après l'administration du produit (4, 4-8, 8-12 et 12-24 heures).

- 5 Une gélule gastro-résistante est également développée pour ce produit de façon à pouvoir l'utiliser dans les études cliniques chez l'homme.

Les résultats obtenus au cours de la première phase d'étude de doses croissantes ont montré que l'étazolate était bien toléré et n'a pas entraîné  
10 d'effets secondaires. De plus, les dosages plasmatiques ont confirmé chez l'homme la bonne absorption du produit aux doses fortes.

L'ensemble de ces résultats démontre que des composés selon l'invention présentent des propriétés remarquables sur la survie des neurones, en  
15 particuliers rétiniens, et peuvent être administrés à l'homme sans effets secondaires. Ces résultats permettent donc le développement de nouvelles approches thérapeutiques efficaces des maladies neurodégénératives oculaires chez l'homme.

## REVENDECATIONS

1. Utilisation d'un composé inhibiteur de la PDE4 appartenant à la famille des pyrazolopyridines pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée à augmenter la survie neuronale chez les patients atteints de maladies neurodégénératives oculaires.
2. Utilisation selon la revendication 1, pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée à inhiber ou réduire la mort neuronale par excitotoxicité lors des maladies neurodégénératives oculaires.
3. Utilisation selon la revendication 1, caractérisée en ce que le composé est en outre un ligand du récepteur périphérique aux benzodiazépines (PBR).
4. Utilisation selon la revendication 1 ou 3, caractérisée en ce que le composé est en outre un ligand des récepteurs au GABA de type GABA(A).
5. Utilisation selon la revendication 1, caractérisée en ce que le composé est choisi parmi l'étazolate et le tracazolate, de préférence l'étazolate.
6. Utilisation selon la revendication 1, caractérisée en ce que le composé est choisi parmi les composés suivants :
- Ester éthylique de l'acide 4-butylamino-1-ethyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique
- 1-(4-amino-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-1-yl)- $\beta$ -*D*-1-deoxy-ribofuranose
- Ester éthylique de l'acide 1-ethyl-4-(*N'*-isopropylidene-hydrazino)-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique (SQ 20009),
- 4-amino-6-methyl-1-*n*-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine
- Ester éthylique de l'acide 4-Amino-1-ethyl-6-methyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique (desbutyl tracacolate),
- 4-amino-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxamide,



Ester éthylique de l'acide 1-ethyl-6-methyl-4-methylamino-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,

- 5 Ester éthylique de l'acide 4-amino-6-methyl-1-propyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,

Ester éthylique de l'acide 1-ethyl-4-ethylamino-6-methyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,

- 10 Ester éthylique de l'acide 4-amino-1-butyl-6-methyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,

5-(4-amino-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-1-yl)-2-hydroxymethyl-tetrahydro-furan-3-ol,

- 15 ester allylique de l'acide 1-allyl-4-amino-6-methyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,

acide 4-amino-6-methyl-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,

- 20 ester éthylique de l'acide 4-amino-1-ethyl-3,6-dimethyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,

- 25 ester éthylique de l'acide 4-diméthylamino-1-ethyl-6-methyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,

ester éthylique de l'acide 1-ethyl-6-methyl-4-propylamino-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,

- 30 ester éthylique de l'acide 4-amino-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,

ester éthylique de l'acide 4-amino-6-methyl-1-pent-4-ynyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,

- 35 4-amino-1-but-3-enyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-allylamide,

4-amino-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-isopropylamide,

- 40 4-amino-1-pentyl-*N*-*n*-propyl-1*H*-pyrazolo-[3,4-*b*]pyridine-5-carboxamide,

ester allylique de l'acide 4-amino-1-butyl-6-methyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,

- 45 ester éthylique de l'acide 4-amino-6-methyl-1-pent-3-ynyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,

4-amino-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-prop-2-ynylamide

- ester allylique de l'acide 4-amino-1-(3-methyl-butyl)-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
- 5 4-amino-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-*N*-(2-propenyl)carboxamide,  
ester allylique de l'acide 4-amino-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
- 10 4-amino-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-butylamide,  
ester allylique de l'acide 4-amino-1-but-3-ynyl-6-methyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
- 15 ester allylique de l'acide 4-amino-1-but-3-enyl-6-methyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,  
4-amino-6-methyl-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-allylamide,
- 20 ester allylique de l'acide 4-amino-6-methyl-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,  
ester allylique de l'acide 4-amino-6-methyl-1-(3-methyl-butyl)-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
- 25 ester isobutylique de l'acide 4-amino-6-methyl-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,  
4-amino-6-methyl-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-butylamide,
- 30 ester allylique de l'acide 4-amino-6-methyl-1-(3-methyl-but-2-enyl)-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,  
4-amino-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-cyclopropylamide,
- 35 ethyl 4-amino-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-hydroxamate,  
ester prop-2-ynylque de l'acide 4-amino-6-methyl-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
- 40 ester allylique de l'acide 4-amino-6-methyl-1-pent-4-ynyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,  
ester allylique de l'acide 4-amino-6-methyl-1-pent-4-enyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
- 45 4-amino-1-pent-3-ynyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-propylamide,

- 4-amino-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-cyclopropylmethyl-amide,  
ester 2-méthyl-allylique de l'acide 4-amino-6-méthyl-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
- 5 4-Amino-1-pent-3-ynyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-allylamide (ICI 190,622),  
4-amino-1-pent-4-ynyl-N-2-propenyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxamide,
- 10 4-amino-1-pent-3-ynyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-prop-2-ynylamide,  
4-amino-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-but-2-ynylamide,  
ester allylique de l'acide 4-amino-6-méthyl-1-pent-3-ynyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
- 15 ester allylique de l'acide 4-amino-1-(2-cyclopropyl-ethyl)-6-méthyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,  
ester allylique de l'acide 4-amino-1-hex-5-ynyl-6-méthyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
- 20 4-amino-1-pent-3-ynyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-cyclopropylmethyl-amide,  
ester but-3-énylique de l'acide 4-amino-6-méthyl-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
- 25 ester cyclopropylméthylique de l'acide 4-amino-6-méthyl-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
- 30 4-butylamino-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-allylamide,  
ester 2-cyclopropyl-ethylique de l'acide 4-amino-6-méthyl-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
- 35 ester cyclopropylméthylique de l'acide 4-amino-6-méthyl-1-pent-3-ynyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,  
ester cyclopropylméthylique de l'acide 4-amino-6-méthyl-1-pent-4-ynyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,
- 40 ester éthylique de l'acide 4-amino-1-benzyl-6-méthyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,  
4-amino-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-benzylamide,
- 45 4-amino-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-phenylamide,

ester benzylique de l'acide 4-amino-6-methyl-1-pentyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,

4-Azido-1-β-D-ribofuranosylpyrazolo[3,4-*b*]pyridine,

1-pent-3-ynyl-N-2-propenyl-4-propionamido-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxamide,

2-(4-amino-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-1-yl)-5-hydroxymethyl-tetrahydro-furan-3,4-diol,

2-(6-methyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-4-ylamino)-ethanol,

3-(6-methyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-4-ylamino)-propan-1-ol,

ester propylique de l'acide 3-(6-methyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-4-ylamino)-acétique,

ester éthylique de l'acide 2-(6-methyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-4-ylamino)-propionique,

ester éthylique de l'acide 2-(6-methyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-4-ylamino)-pentanoïque,

ester éthylique de l'acide 2-(6-methyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-4-ylamino)-benzoïque,

ester propylique de l'acide 3-(6-methyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-4-ylamino)-pentanoïque,

*N*-benzylidene-*N'*-(3-methyl-1-phenyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-4-yl)-hydrazine,

*N*-furan-2-ylmethylene-*N'*-(3-methyl-1-phenyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-4-yl)-hydrazine,

*N*-(4-fluoro-benzylidene)-*N'*-(3-methyl-1-phenyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-4-yl)-hydrazine,

*N*-(3-furan-2-yl-allylidene)-*N'*-(3-methyl-1-phenyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-4-yl)-hydrazine,

*N*-(4-methoxy-benzylidene)-*N'*-(3-methyl-1-phenyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-4-yl)-hydrazine,

4-[(3-methyl-1-phenyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-4-yl)-hydrazonomethyl]-benzonitrile,

*N*-benzo[1,3]dioxol-5-ylmethylene-*N'*-(3-methyl-1-phenyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-4-yl)-hydrazine,

5 *N*-(3-methyl-1-phenyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-4-yl)-*N'*-(4-nitro-benzylidene)-hydrazine,

*N*-(3-methyl-1-phenyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-4-yl)-*N'*-(2-nitro-benzylidene)-hydrazine,

10 *N*-(3-methyl-1-phenyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-4-yl)-*N'*-(4-trifluoromethyl-benzylidene)-hydrazine,

*N*-(3-methyl-1-phenyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-4-yl)-*N'*-(5-nitro-furan-2-ylmethylene)-hydrazine,

15 *N*-(3-methyl-1-phenyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-4-yl)-*N'*-(2-trifluoromethyl-benzylidene)-hydrazine,

20 *N*-(3-methyl-1-phenyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridin-4-yl)-*N'*-(6-nitro-benzo[1,3]dioxol-5-ylmethylene)-hydrazine,

Acide 4-(3-chloro-4-methoxy-benzylamino)-1-ethyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,

25 4-(3-chloro-4-methoxy-benzylamino)-1-ethyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-(pyridin-4-ylmethyl)-amide,

4-(3-chloro-4-methoxy-benzylamino)-1-ethyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-(tetrahydro-furan-2-ylmethyl)-amide,

30 4-(3-chloro-4-methoxy-benzylamino)-1-ethyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-(5-hydroxy-pentyl)-amide,

35 4-(3-chloro-4-methoxy-benzylamino)-1-ethyl-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-[3-(2-oxo-pyrrolidin-1-yl)-propyl]-amide,

ester éthylique de l'acide 4-*tert*-butylamino-1-(2-chloro-2-phenyl-ethyl)-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,

40 ester éthylique de l'acide 1-(2-chloro-2-phenyl-ethyl)-4-cyclopropylamino-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,

ester éthylique de l'acide 1-(2-chloro-2-phenyl-ethyl)-4-propylamino-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,

45 ester éthylique de l'acide 1-(2-chloro-2-phenyl-ethyl)-4-phenylamino-1*H*-pyrazolo[3,4-*b*]pyridine-5-carboxylique,

ester éthylique de l'acide 4-butylamino-1-(2-chloro-2-phenyl-ethyl)-1H-pyrazolo[3,4-b]pyridine-5-carboxylique,

5 ester éthylique de l'acide 1-(2-chloro-2-phenyl-ethyl)-4-(2-ethoxy-ethylamino)-1H-pyrazolo[3,4-b]pyridine-5-carboxylique,

ester éthylique de l'acide 4-benzylamino-1-(2-chloro-2-phenyl-ethyl)-1H-pyrazolo[3,4-b]pyridine-5-carboxylique, et

10 ester éthylique de l'acide 1-(2-chloro-2-phenyl-ethyl)-4-phenethylamino-1H-pyrazolo[3,4-b]pyridine-5-carboxylique.

7. Utilisation selon la revendication 1, caractérisée en ce que le composé est un acide nucléique anti-sens capable d'inhiber la transcription du gène de la PDE4B ou la traduction du messager correspondant.

8. Utilisation selon l'une quelconque des revendications précédentes, pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée à augmenter la survie neuronale chez les patients atteints de dégénérescences de la rétine.

20

9. Utilisation selon l'une quelconque des revendications précédentes, pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée à augmenter la survie neuronale chez les patients atteints de rétinite pigmentaire, de dégénérescence maculaire liée à l'âge, des conséquences rétinienne du glaucome ou d'une

25

10. Utilisation de l'étazolate pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement des maladies neurodégénératives oculaires.

30

11. Utilisation de l'étazolate pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée à augmenter la survie neuronale chez les patients atteints de maladies neurodégénératives oculaires.

35 12. Utilisation de l'étazolate pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée à inhiber ou réduire la mort neuronale par

excitotoxicité chez les patients atteints de maladies neurodégénératives oculaires.

13. Utilisation selon l'une des revendications 10 à 12, caractérisée en ce que la  
5 maladie neurodégénérative oculaire est la rétinite pigmentaire.

14. Utilisation selon l'une des revendications 10 à 12, caractérisée en ce que la  
maladie neurodégénérative oculaire est la dégénérescence maculaire liée à  
l'âge.

10 15. Utilisation selon l'une des revendications 10 à 12, caractérisée en ce que la  
maladie neurodégénérative oculaire est la conséquence sur les neurones  
rétiniens de la présence et de l'évolution d'un glaucome.

15 16. Utilisation selon l'une des revendications 10 à 12, caractérisée en ce que la  
maladie neurodégénérative oculaire est une rétinopathie.

17. Utilisation selon l'une des revendications 10 à 16, caractérisée en ce que  
l'étazolate est administré sous forme orale.

20 18. Composition pharmaceutique comprenant un composé choisi parmi  
l'étazolate et le tracazolate, et un excipient acceptable sur le plan  
pharmaceutique et permettant une administration rétro- et/ou intra-oculaire.

25 19. Méthode de détection d'une situation d'excitotoxicité ou de stress neuronal  
chez un sujet, comprenant la mesure in vitro de l'expression de AKAP1 et/ou de  
GABA(A)RAPL1 dans un échantillon provenant du sujet, ou la détection de la  
présence d'une forme mutée de l'ARN de AKAP1 et/ou de GABA(A)RAPL1  
dans ledit échantillon.

30 20. Méthode de sélection, identification ou caractérisation de composés actifs  
sur les pathologies associées à l'excitotoxicité, ou au stress neuronal,

notamment sur les pathologies neurodégénératives oculaires, comprenant la mise en contact de composés tests avec la PDE4B (notamment un variant dépourvu de domaine 3' non-codant), AKAP1 et/ou GABA(A)RAPL1, ou avec une cellule exprimant celle(s)-ci, et la mise en évidence des composés se liant à  
5 cette protéine ou inhibant l'expression ou l'activité de cette protéine.



1/8

# Analyse d'expression d'isoforme de PDE4B dans le cerveau par PCR semi-quantitative

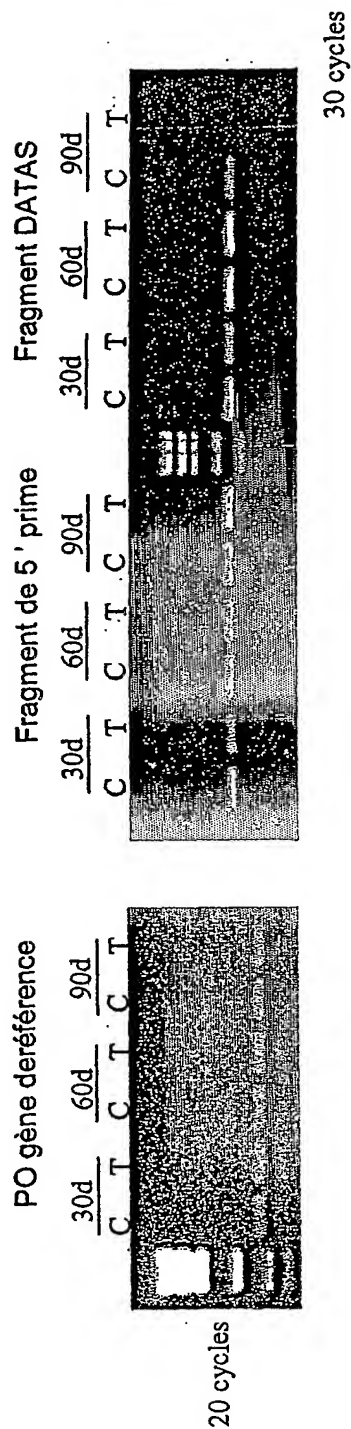
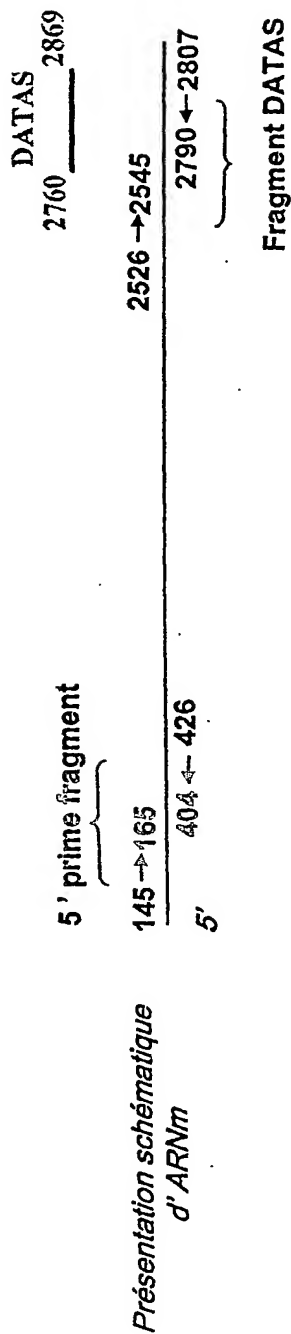


Figure 1A

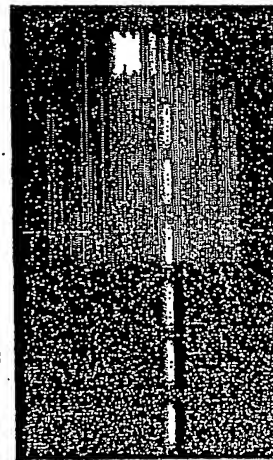
2/8

# MUSCLE

PDE4B (5')  
 145 → 165  
 404 ← 426  
 2526 → 2545  
 2760 → 2869  
 2790 ← 2807  
 PDE4B (DATAS)

PO

30d    60d    90d  
 C   T   C   T   C   T

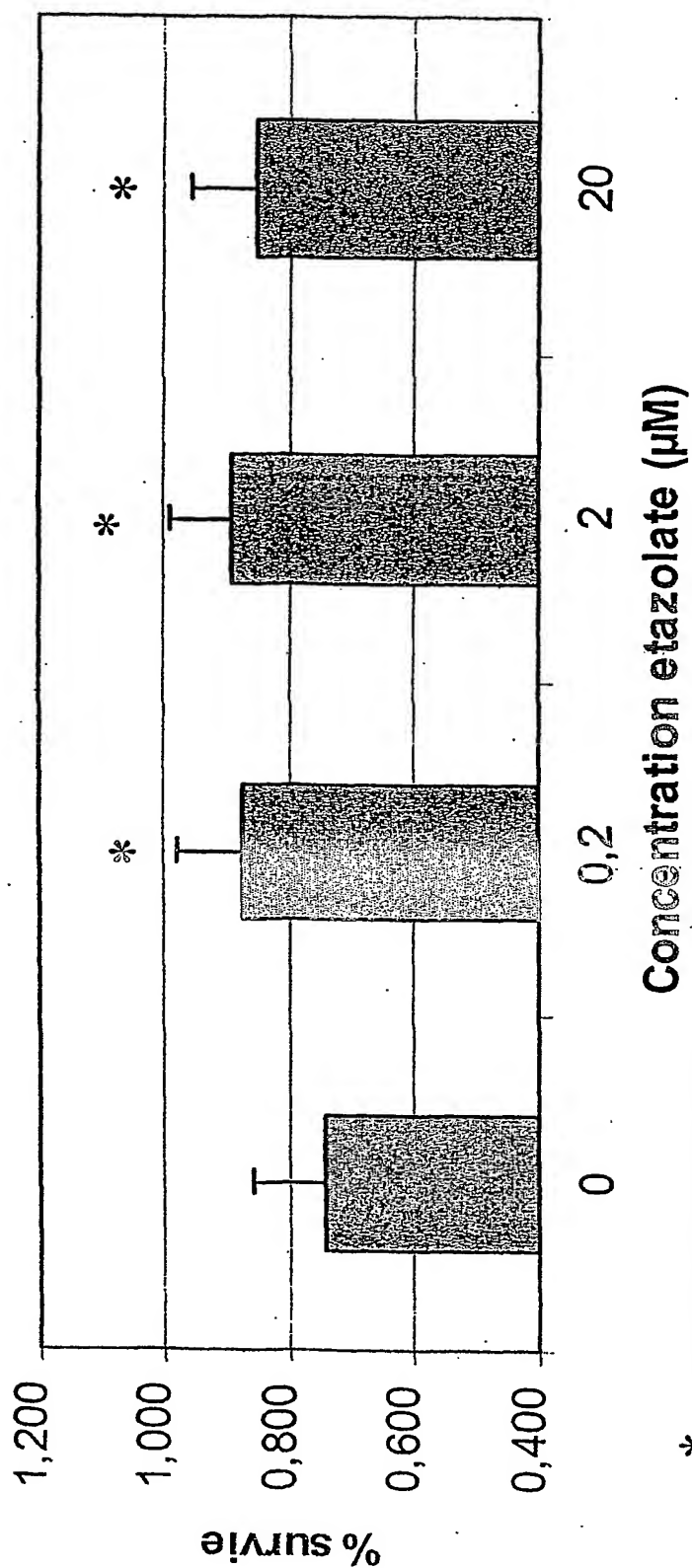


PDE4B (5')  
 30d    60d    90d  
 C   T   C   T   C   T   C   T   C   T



Figure1B

3/8



\*: p < 0.05 Wilcoxon test

Figure 2

4/8

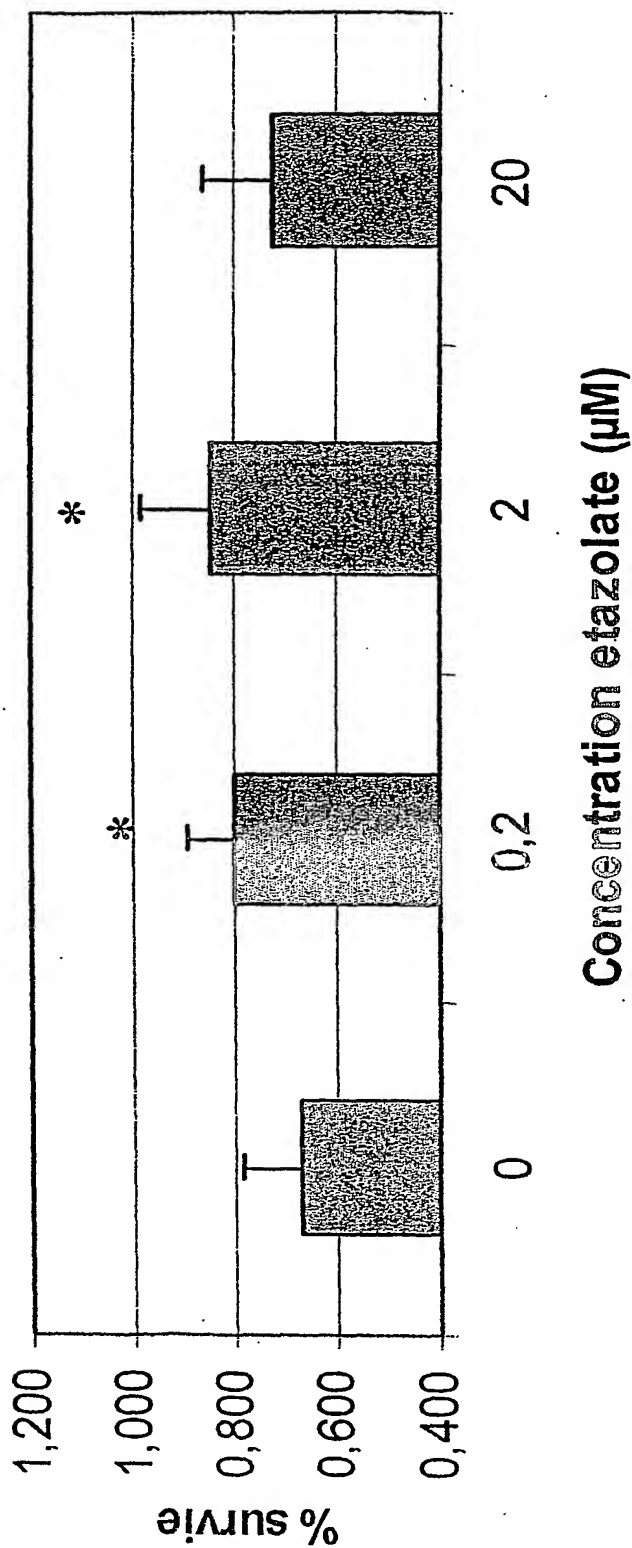
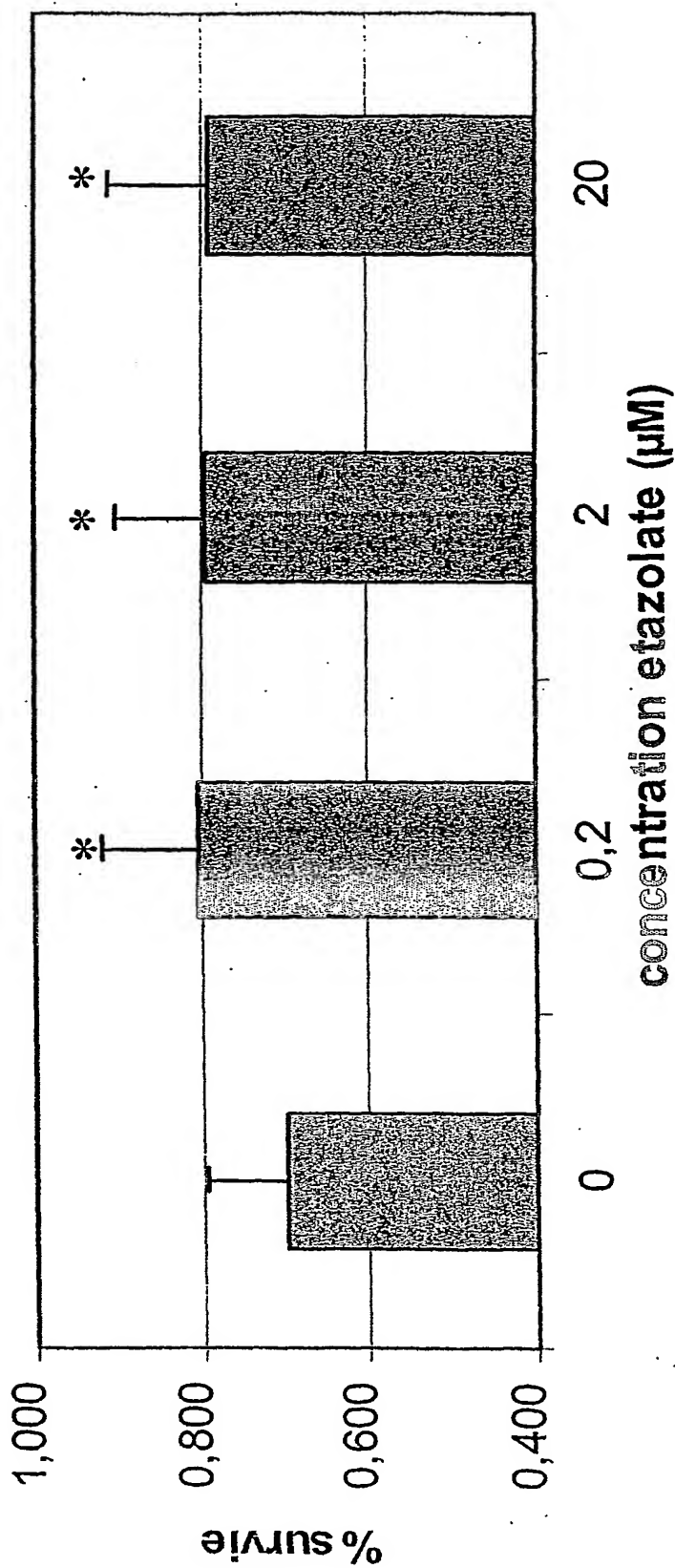
\*:  $p < 0.05$  Wilcoxon test

Figure 3

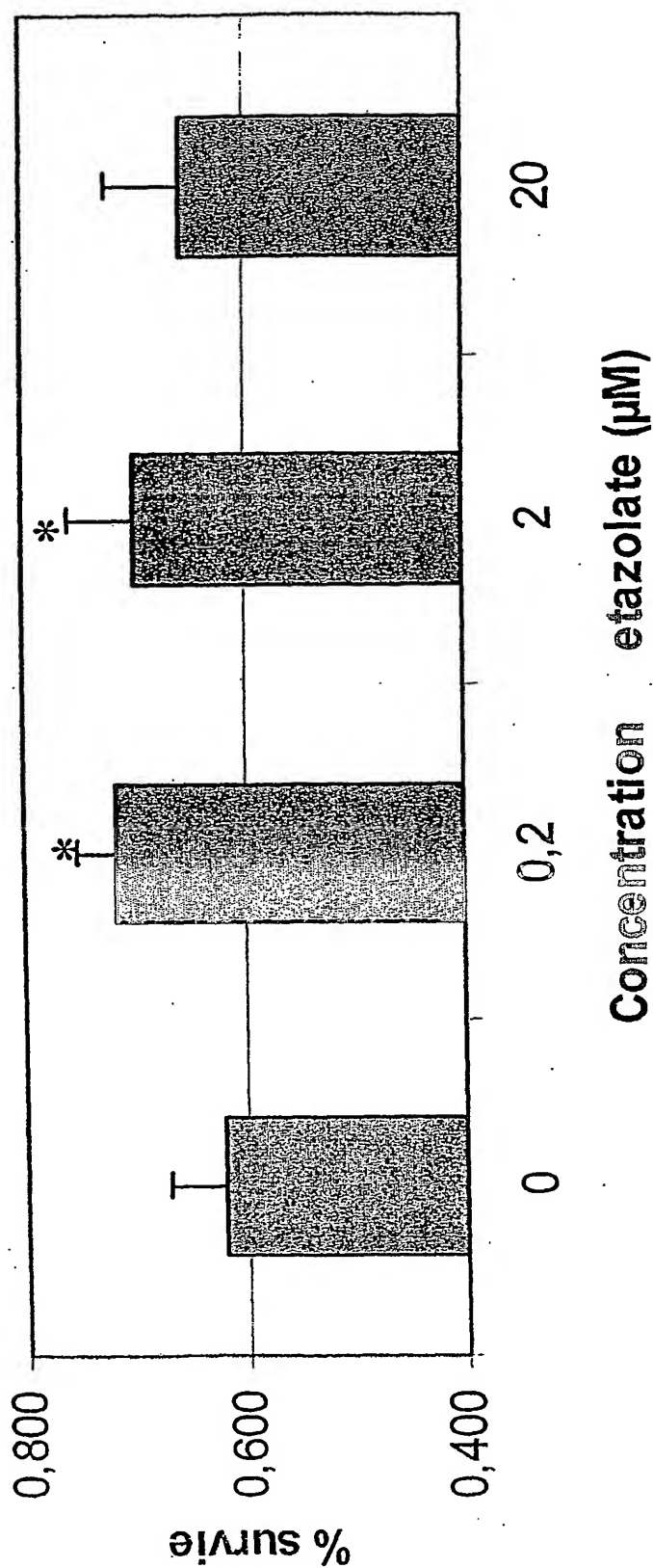
5/8



\*: p &lt; 0.05 Wilcoxon test

Figure 4

6/8



\*: p &lt; 0.05 Wilcoxon test

Figure 5

7/8

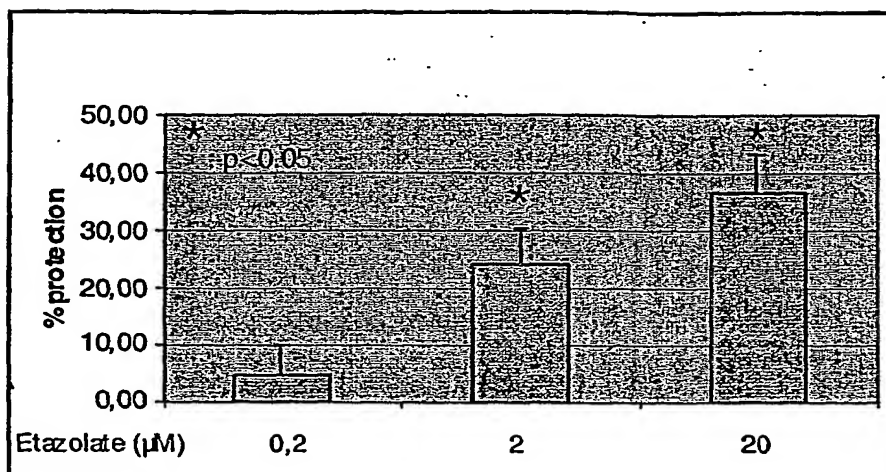
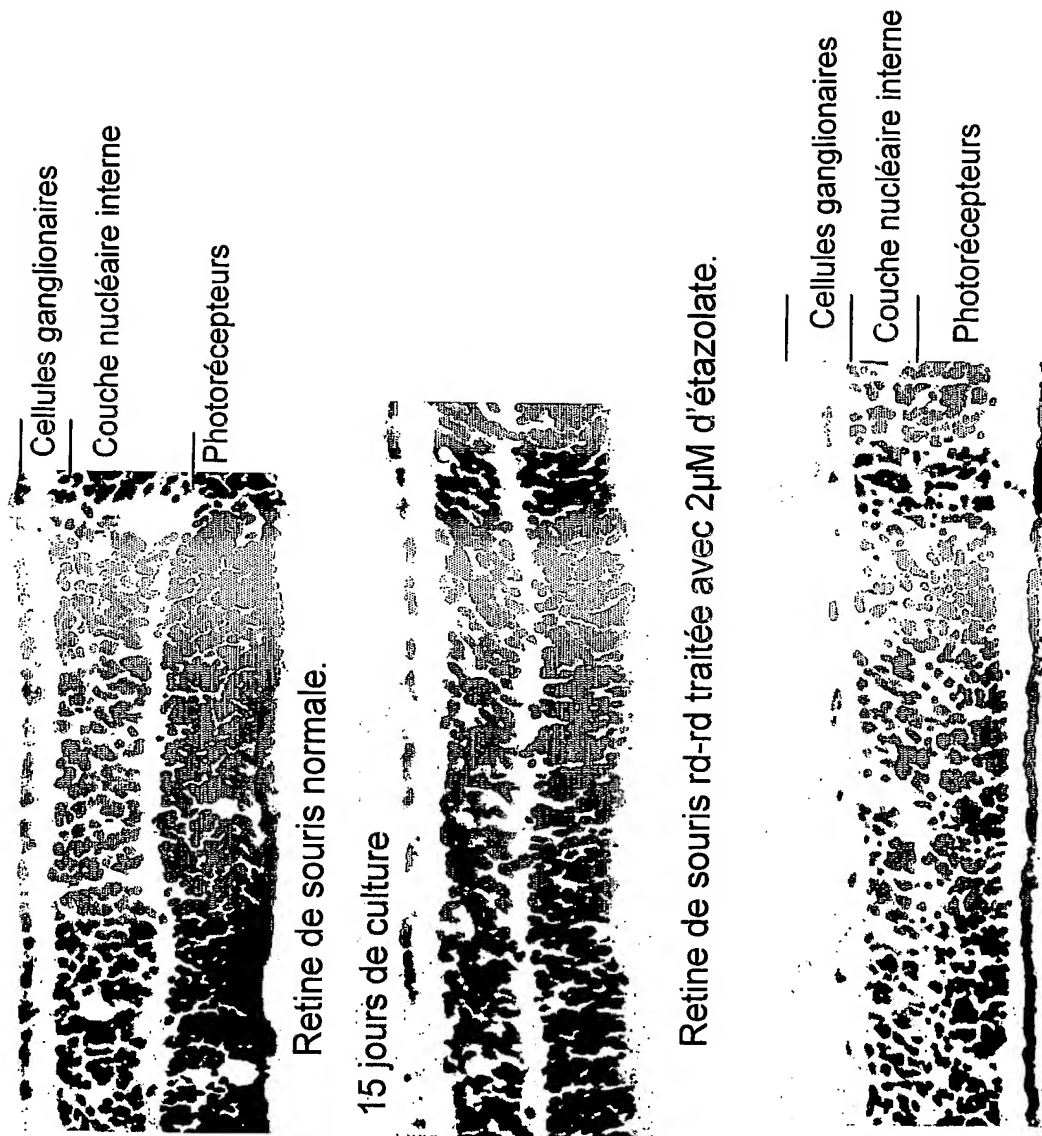


Figure 6

8/8

FIGURE 7





JC20 Rec'd PCT/PTO 07 JUL 2005

## SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; EXONHIT THERAPEUTICS

<120> Méthodes et compositions pour le traitement de pathologies  
dégénératives oculaires

&lt;130&gt; B0189WO

&lt;150&gt; FR 03 02021

&lt;151&gt; 2003-02-19

&lt;160&gt; 6

&lt;170&gt; PatentIn version 3.1

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; artificial sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; amorce

&lt;400&gt; 1

gccaggccgt gaagcaaata

20

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 18

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; artificial sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; amorce

&lt;400&gt; 2

tcaaagacgc gaaaacat

18

&lt;210&gt; 3

2

<211> 21  
<212> DNA  
<213> artificial sequence

<220>

<223> amorce

<400> 3  
ccgcgtcagt gcctttgcta t

21

<210> 4

<211> 23

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> amorce

<400> 4  
cgctgtcgga tgcttttatt cac

23

<210> 5

<211> 19

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> amorce

<400> 5  
tcgctttctg gaggggtgc

19

<210> 6

<211> 18

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> amorce

<400> 6  
ccgcaggggc agcagtgg

18

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**